AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Desenvolvimento de métodos de purificação do Gálio-67 e Gálio-68 para a marcação de biomolécula

Renata Ferreira Costa

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do Grau de Doutor em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear - Aplicações

Orientador:
Prof. Dr. João Alberto Osso Júnior

São Paulo
2012

Aos meus pais Neli e Gilberto

À minha irmã Giuliana Braga

AGRADECIMENTOS

À Deus,

Aos meus pais, Neli F. Costa e Gilberto J. Costa e à minha Irmã, Giuliana Braga, pelo exemplo de vida. Agradeço pelo amor, carinho e compreensão do meu trabalho,

Ao Dr. João Alberto Osso Junior, agradeço pelo apoio, oportunidade e por todos os ensinamentos. Serei eternamente grata,

À Marycel Figols de Barboza, pelo carinho, ensinamentos e exemplo de vida,

Às Dras. Fátima M.S. de Carvalho e Josiane Zini, agradeço por tudo. Vocês foram essenciais no desenvolvimento deste trabalho,

Ao Dr. Gerald Reischl pelos ensinamentos e acolhimento na Universidade de Tuebingen (Alemanha). Ao DAAD pelo apoio financeiro,

Aos funcionários da Diretoria de Radiofarmácia, em especial, Patrícia Martins, pela paciência e amizade. Wagner Nieto, pelo projeto desenvolvido. Ana e Marcos por toda a gentileza. À Fátima Gili por todo o carinho. Ao Pires, pelos ensinamentos. Ao Luis Alberto, por toda sua ajuda,

Aos amigos, que estiveram presentes no laboratório e que me auxiliaram de alguma maneira neste trabalho,

Ao Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN-CNEN/SP) por possibilitar a realização do trabalho,

À CAPES, pelo apoio financeiro durante todo o período do meu trabalho.

“E ainda que tivesse o dom de profecia, e conhecesse todos os mistérios e toda a ciência, e ainda que tivesse toda a fé, de maneira tal que transportasse os montes, e não tivesse amor, nada seria.”

1 Coríntios 13:2

"Cada sonho que você deixa para trás,
é um pedaço do seu futuro
que deixa de existir."

Steve Jobs

Desenvolvimento de Métodos de Purificação do ^{67}Ga e ^{68}Ga para a Marcação de Biomoléculas

RENATA FERREIRA COSTA

RESUMO

Há mais de 50 anos os geradores de ^{68}Ge/^{68}Ga vêm sendo desenvolvidos, obtendo o ^{68}Ga sem a necessidade da instalação de um cíclotron próximo à radiofarmácia ou ao centro hospitalar que tenha um PET/CT. O ^{68}Ga é um emissor de pósitron com baixa emissão de fóton (β^+, 89%, 1077 keV) e meia vida de 67,7 minutos, compatível com a farmacocinética de moléculas de baixo peso molecular, como peptídeos e fragmentos de anticorpos. Além disso, a química do Ga permite a ligação estável com agentes quelantes acoplados com peptídeos, como o DOTA. Todas estas características do ^{68}Ga aliado a tecnologia PET/CT permitiram avanços em imagem molecular, como no diagnóstico de doenças de origem neuroendócrina. Entretanto, o eluato de ^{68}Ga proveniente dos geradores de ^{68}Ge/^{68}Ga comerciais, ainda contém altos níveis de contaminantes, como o ^{68}Ge e outros metais que competem quimicamente com o ^{68}Ga, como o Fe^{3+} e Zn^{2+} e, como consequência, há redução do rendimento de marcação com biomoléculas. Quanto menor a quantidade de impurezas no eluato, a competição entre o peptídeo radiomarcado e peptídeo não marcado será menor e a qualidade de imagem será melhor, por isso existe a necessidade de diminuir a quantidade destes metais. Portanto, os objetivos deste trabalho são avaliar os métodos de purificação do ^{68}Ga para a marcação de biomoléculas, com ênfase no estudo das impurezas químicas presentes nos radioisótopos primários, e desenvolver um método de purificação inédito. Diversos métodos de purificação foram estudados. Na purificação em resina catiônica tradicional e comercial, em que o ^{68}Ga é adsorvido em resina catiônica e eluído em uma solução de acetona/ácido, a resina utilizada não é disponível comercialmente. Várias resinas catiônicas foram testadas simulando o processo comercial, e o uso das menores partículas da resina catiônica AG50W-X4 (200-400 mesh) foi a que apresentou os melhores resultados. Um método inovador foi a cromatografia por extração, onde o éter diisopropílico é adsorvido em resina XAD 16 e o ^{68}Ga eluído em água deionizada. Apesar dos resultados de recuperação do ^{68}Ga e a separação entre o ^{68}Ga e o ^{65}Zn terem sido bons, não houve reprodutibilidade na

purificação dos metais. O método mais promissor e inédito foi a purificação do ^{68}Ga em resina catiônica em meio básico que apresentou bons resultados, principalmente em relação à redução do Zn (98 ± 2)%, o contaminante químico encontrado em maior abundância no eluato de ^{68}Ga. A redução total de impurezas foi (95 ± 4)%. Os peptídeos DOTATOC/DOTATATO foram marcados com o ^{68}Ga em três diferentes formas: purificado em meio básico, por extração por solventes e sem a purificação prévia, o melhor resultado de rendimento de marcação do ^{68}Ga – DOTATATO foi obtido após a purificação do ^{68}Ga em meio básico, comprovando a eficiência do processo.

Palavras Chaves: *Radiofarmácia, Gerador de ^{68}Ge-^{68}Ga, Purificação do ^{68}Ga*

Development of Methods for the Purification of ^{67}Ga and ^{68}Ga for Biomolecules Labeling

RENATA FERREIRA COSTA

ABSTRACT

For more than fifty years, the long-lived ^{68}Ge/^{68}Ga generators have been in development, obtaining ^{68}Ga without the need of having in house cyclotron, which is a considerable convenience for PET centers that have no nearby cyclotrons. ^{68}Ga decays 89% by positron emission and low photon emission (1077 keV) and the physical half life of 67.7 minutes is compatible with the pharmacokinetics of low biomolecular weight substances like peptides and antibody fragments. Moreover, its established metallic chemistry allows it to be stably bound to the carrier peptide sequence via a suitable bifunctional chelator, such as DOTA. All these reasons together with the technology of PET/CT allowed advances in molecular imaging, in particular in the diagnosis of neuroendocrine diseases. However, the eluate from the commercial ^{68}Ge/^{68}Ga generators still contains high levels of long lived ^{68}Ge, besides other metallic impurities, which competes with ^{68}Ga with a consequent reduction of the labeling yield of biomolecules, such as Fe^{3+} and Zn^{2+}. Thus, the lower the amount of impurities in the eluate, the competition between the radiolabeled and unlabeled peptide by the receptor will be smaller and the quality of imaging will be better, a subsequent purification step is needed after the generator elution. The aim of this work is to evaluate different purifications methods of ^{68}Ga to label biomolecules, with emphasis on the study of the chemical impurities contained in the eluate and to develop a new purification method. Several purification methods were studied. Many cationic resin were tested simulating the commercial process. ^{68}Ga is adsorbed in cationic resin, which is not commercial available and eluted in acid/acetone solution. The use of minor particles of cationic resin AG50W-X4 (200-400 mesh) showed the best results. An innovate method was the extraction chromatography, wich is based on the absorption of diisopropyl ether in XAD 16 and ^{68}Ga recovery in deionized water. Although the results regarding to ^{68}Ga recovery and the radiochemical separation between ^{68}Ga and ^{65}Zn were excellent, there was no reproducibility on the purification of metals. The

most promising and innovative method was the ^{68}Ga purification performed by cationic resin in basic media, which presented the best results, especially regarding the Zn reduction (98 ± 2)%, the chemical contaminant found in great abundance in ^{68}Ga eluate. The total impurities reduction was (95 ± 4)%. The peptides DOTATOC/DOTATATE were labeled ^{68}Ga in three different forms: purified ^{68}Ga in basic solution, through solvent extraction and no purified ^{68}Ga. The best result was achieved with DOTATATE labeling with purified ^{68}Ga in basic media, proving the purification process efficiency.

Keywords: *Radiopharmacy, ^{68}Ge-^{68}Ga Generator, ^{68}Ga purification*

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVO	3
3. JUSTIFICATIVA	4
4. REVISÃO DE LITERATURA	5
4.1- Gálio	5
4.1.1 – Histórico do Uso do Gálio Radioativo	5
4.1.2- Gálio-67	8
4.1.2.1 – Uso Clínico do Gálio-67	8
4.1.2.2– Perspectivas do uso do Gálio-67	10
4.2- Sistemas de Geradores de Radionuclídeos usados em Medicina Nuclear	15
4.2.2- Gerador de ^{68}Ge-^{68}Ga	17
4.2.2.1- Produção do ^{68}Ge	18
4.2.2.2- Evolução dos Geradores de ^{68}Ge-^{68}Ga	20
4.2.2.3– Purificação e Concentração do Eluato de ^{68}Ga	27
4.3- Imagem Molecular em Medicina Nuclear	33
4.3.1 - Agentes Quelantes	34
4.3.1.1 - Agentes Quelantes para Gálio	37
4.3.2 – Radiofármacos Destinados a Alvos Específicos	42
4.3.2.1 – Anticorpos Monoclonais	42
4.3.2.2 – Peptídeos	47
4.3.2.2.1- Somatostatina	48
5. MATERIAIS E MÉTODOS	54
5.1- Infraestrutura e Equipamentos	54
5.2 Reagentes e Materiais em Geral	55

5.3- Métodos 57

5.3.1- Gerador de $^{68}Ge/^{68}Ga$ e ^{67}Ga 57

5.3.2 – Controle de Qualidade do Gerador de ^{68}Ge - ^{68}Ga 58

5.3.3 – Controle Radionuclídico 58

5.3.4 – Controle Químico 60

5.3.4.1 – Fundamentos Teóricos da Espectrometria por Emissão Atômica ... 61

5.3.5 – Produção do ^{65}Zn 62

5.3.6 – Purificação da Água 64

5.3.7- Purificação do $^{67/68}Ga$ 64

5.3.7.1 – Purificação do $^{67/68}Ga$ através da Troca Iônica 64

5.3.7.1.2 – Estudos de Purificação do $^{67/68}Ga$ em Resina de Troca Catiônica 67

5.3.7.1.3 – Escolha da Coluna Cromatográfica 69

5.3.7.1.4 – Estudo Comparativo da ativação da resina catiônica com ácido/base e ácido 70

5.3.7.1.5 – Estudo Comparativo de Resinas Catiônicas comercialmente disponíveis em relação a AG50W-X8 (>400 mesh)..... 71

5.3.7.1.6 – Estudo de Purificação do ^{68}Ga Usando as Menores Partículas das Resinas AG50W-X4 (200-400 mesh) e AG50W-X8 (200-400 mesh) 72

5.3.7.1.7- Purificação do ^{68}Ga na presença de ^{65}Zn em Resina Catiônica..... 72

5.3.7.2 – Purificação do $^{67/68}Ga$ por Extração por Solventes 73

5.3.7.2.1- Extração por Solventes – Líquido-Líquido 74

5.3.7.2.2- Cromatografia de Extração por solventes 74

5.3.7.2.2.1– Purificação do ^{68}Ga por Extração por Solventes em Coluna Cromatográfica na presença de ^{65}Zn 77

5.3.7.2.2.3–Determinação do Coeficiente de Distribuição do ^{68}Ga e ^{65}Zn 77

5.3.7.3 - Purificação do ^{68}Ga por Resina Catiônica em Meio Básico 77

5.3.8- Marcação do DOTATOC com ^{68}Ga 79

5.3.8.1- Marcação do DOTATOC com ^{68}Ga em meio acetona/HCl 79

5.3.8.2- Marcação do DOTATATO com ^{68}Ga 80

6. RESULTADOS E DISCUSSÕES..... 82

6.1 - Gerador de ^{68}Ge/^{68}Ga 82

6.2 – Irradiação do ^{65}Zn 86

6.3 – Purificação da Água 86

6.4 - Presença de Espécies Metálicas Consideradas Contaminantes do Eluato de ^{68}Ga e Reagentes e Controle Radionuclídico 86

6.5-Purificação do $^{67/68}$Ga 88

6.5.1 – Purificação do $^{67/68}$Ga em resina catiônica 88

6.5.1.2 – Escolha da Coluna Cromatográfica 88

6.5.1.3 – Estudo Comparativo da Ativação da Resina Catiônica com ácido/base e apenas ácido 90

6.5.1.4 - Estudo Comparativo de Resinas Catiônicas comercialmente disponíveis em relação a AG50W-X8 (>400 mesh) 90

6.5.1.5 – Estudo de Purificação do ^{68}Ga Usando as Menores Partículas das Resinas AG50W-X4 (200-400 mesh) e AG50W-X8 (200-400 mesh) 95

6.5.1.6 - Purificação do ^{68}Ga em Resina Catiônica na presença de ^{65}Zn 97

6.5.2 – Purificação do $^{67/68}$Ga por Extração por Solventes 99

6.5.2.1- Extração por Solventes – Líquido-Líquido 99

6.5.2.2 - Extração por Solventes em Coluna Cromatográfica 99

6.5.2.2.1 - Efeito da Adição de Agentes Redutores para reduzir Fe^{3+} para Fe^{2+} 100

6.5.2.2.2. – Purificação do ^{68}Ga por Extração por Solventes em Coluna Cromatográfica com ^{65}Zn 102

6.5.2.2.2.1 – Coeficiente de distribuição do ^{68}Ga e ^{65}Zn 103

6.5.3 - Purificação do ^{68}Ga por Resina Catiônica em Meio Básico 104

6.5.4 - Comparação entre os métodos de purificação do ^{68}Ga 106

6.6- Marcação do DOTATOC com ^{68}Ga 107

6.6.1 – Comparação da marcação do DOTATATO com ^{68}Ga purificado e não purificado 108

7. CONCLUSÃO 109

REFERÊNCIAS 110

LISTA DE FIGURAS

		Página
FIGURA 1	Cintilografia com ^{67}Ga em Paciente com Linfoma de Hodgkin	10
FIGURA 2	Imagens realizadas em SPECT/CT em camundongos com tumores xenotransplantados após 4h da administração de ^{67}Ga - DOTA-Bz-EDA-folato. A – camundongo controle; B- camundongo em que foi administrado o pemetrexede previamente; C- camundongo em que foi co-administrado ácido fólico	12
FIGURA 3	Concentração de ^{67}Ga- NOTA – PHR no sangue de ratos, após a administração de 1mg do polímero e 1,2MBq de ^{67}Ga.....	14
FIGURA 4	Curva de decaimento e crescimento do gerador de ^{99}Mo/^{99m}Tc em equilíbrio transiente	16
FIGURA 5	Esquema de decaimento do ^{68}Ga	18
FIGURA 6	O crescimento teórico do ^{68}Ga a partir do decaimento do ^{68}Ge	19
FIGURA 7	Imagem de PET (A) realizada com ^{68}Ga -EDTA e CT (B) de um paciente com esclerose múltipla	21
FIGURA 8	Imagens seqüenciais obtidas a 20, 40, 60 e 80 minutos após a administração intravenosa do ^{68}Ga -EDTA. Áreas focais de captação aumentada do traçador são mostradas em ambos, no hemisfério direito (imagens iniciais) e no hemisfério esquerdo (imagens tardias)	21
FIGURA 9	Sistema de gerador de ^{68}Ge-^{68}Ga e o módulo de síntese *IQS® ^{68}Ga Fluidic Labeling System* comercializado pela empresa *ITG Isotope Technologies Garching*.....	25
FIGURA 10	Perfil de Eluição do Gerador de ^{68}Ge-^{68}Ga desenvolvido por	

Chakravarty *et al* (2010) com HCl 0,01 $molL^{-1}$ em fluxo de 1 mL/min..... 26

FIGURA 11 Perfil de eluição do gerador de ^{68}Ge-^{68}Ga..... 30

FIGURA 12 Coeficiente de Distribuição da adsorção do ^{68}Ga no cartucho de resina aniônica Chromafix SAX SPEC..... 31

FIGURA 13 Agentes quelantes de cadeia aberta 36

FIGURA 14 Representação dos agentes quelantes macrocíclicos NOTA, DOTA, TETA..... 37

FIGURA 15 Fórmula Estrutural do DOTATOC. Em destaque o agente quelante DOTA 40

FIGURA 16 Fórmula Estrutural do $DTPA^{-}$ octreotideo. Em destaque o agente quelante DTPA 40

FIGURA 17 Estudo de biodistribuição do DOTATOC marcado com ^{67}Ga, ^{111}In e ^{90}Y em comparação com ^{111}In-DTPA-octreotideo, administrado em camundongos nude com tumor pancreático AR4-2J..... 41

FIGURA 18 Cintilografia de corpo inteiro adquirida com 1 hora e 120 horas após a injeção do ^{131}I-IDEC-C2B8 45

FIGURA 19 Representação do anticorpo intacto e de seus fragmentos modificados, incluindo fragmento único de domínio variável (Fv), cadeia única Fv (scFv), *diabody, minibody* e *scFv-Fc* 46

FIGURA 20 Fórmula Estrutural do DOTATOC, DOTANOC e DOTATATE 51

FIGURA 21 Comparação entre o ^{18}F- FDG (A) e o ^{68}Ga-DOTATOC (B) em paciente com neuroblastoma 52

FIGURA 22 Comparação entre ^{111}In-Octreotídeo (A- imagem anterior, B- imagem posterior), ^{68}Ga-DOTATOC (C) e o ^{18}F- Fluoreto (D), respectivamente. A imagem realizada em PET com a administração de ^{68}Ga-DOTATOC mostra claramente as metástases ósseas confirmadas com o ^{18}F- Fluoreto, enquanto que o ^{111}In-Octreotídeo mostra apenas algumas lesões ósseas..... 53

FIGURA 23 Gerador de ^{68}Ge-^{68}Ga comercializado pela empresa *Cyclotron Co. Ltd*..... 57

FIGURA 24 Detector de germânio hiperpuro da Canberra acoplado a um sistema de multicanal (DIRF-IPEN/CNEN-SP)..... 59

FIGURA 25 Espectrômetro de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (DIRF-IPEN/CNEN-SP)..... 61

FIGURA 26 Reator Nuclear IEA-R1 (IPEN-CNEN/SP)..... 63

FIGURA 27 Estrutura química de uma resina de troca iônica típica..... 66

FIGURA 28 Esquema Básico de Eluição e Purificação do gálio, baseado no trabalho de Zhernosekov *et al* (2007) 69

FIGURA 29 Modelos de coluna usada para a eluição do ^{68}Ga: coluna de vidro com placa porosa G2, seringa padrão de 1mL, Micropipeta plástica (Sigma-Aldrich®, EUA) da esquerda para a direita 70

FIGURA 30 Modelos de coluna usada para a purificação do ^{67}Ga /^{68}Ga: Micropipeta plástica (Sigma-Aldrich®, EUA) e coluna de vidro com placa porosa G2, da esquerda para a direita 75

FIGURA 31 Purificação do $^{67/68}$Ga usando coluna cromatográfica de extração 76

FIGURA 32 Esquema de purificação do ^{68}Ga em resina catiônica em meio básico 78

FIGURA 33 Esquema Básico de Purificação do ^{68}Ga-DOTATOC, baseado no trabalho de Zhernosekov *et al* (2007)..... 80

FIGURA 34 Curva de Eluição do ^{68}Ga proveniente do gerador de $^{68}Ge/^{68}Ga$ em relação a porcentagem da atividade de ^{68}Ga eluída para cada mililitro de HCl 0,1 $molL^{-1}$..... 82

FIGURA 35 Curva de Eluição do ^{68}Ga proveniente do gerador de $^{68}Ge/^{68}Ga$ em relação a atividade (µCi) de ^{68}Ga eluída para cada mililitro de HCl 0,1 $molL^{-1}$..... 82

FIGURA 36 Eficiência de Eluição do gerador de $^{68}Ge/^{68}Ga$ entre os meses de Outubro/2008 até Março/2011 83

FIGURA 37 Eficiência de Eluição do gerador de $^{68}Ge/^{68}Ga$ entre os meses de Abril/2011 até Fevereiro/2012 83

FIGURA 38 Eficiência de eluição do gerador de $^{68}Ge/^{68}Ga$ (adquirido em 2008) em relação ao tempo de uso 84

FIGURA 39 Eficiência de eluição do gerador de $^{68}Ge/^{68}Ga$ (adquirido em 2011) em relação ao tempo de uso 85

FIGURA 40 Nível de impurezas do eluato realizadas durante cinco dias consecutivos 85

FIGURA 41 Curva de Calibração do Zn 87

FIGURA 42 Redução das impurezas presentes no eluato com os intervalos de eluição 100

FIGURA 43 Coeficiente de Distribuição do ^{68}Ga em éter diisopropílico adsorvido na resina XAD-16 em função da concentração de HCl 103

FIGURA 44 Coeficiente de Distribuição do ^{65}Zn em éter diisopropílico adsorvido na resina XAD-16 em função da concentração de HCl 103

FIGURA 45 Perfil eluição do ^{68}Ga e ^{65}Zn em resina catiônica em meio básico 104

LISTA DE TABELAS

		Página
TABELA 1	Sistema de Geradores de Radionuclídeos com Equilíbrio Secular	16
TABELA 2	Reações Nucleares mais Relevantes para a Produção de ^{68}Ge	19
TABELA 3	Concentração de metais (em µg/mL) no eluato de ^{68}Ga do gerador de ^{68}Ge-^{68}Ga proveniente da empresa *iThemba* em relação ao tempo de uso	24
TABELA 4	Geradores de ^{68}Ge/^{68}Ga comerciais	25
TABELA 5	Condições de marcação e parâmetros de qualidade da marcação de peptídeos conjugados com ^{68}Ga purificado em resina aniônica	32
TABELA 6	Agentes Quelantes Bifuncionais	35
TABELA 7	Anticorpos Monoclonais usados em aplicações clínicas e aprovados pelo *FDA*	44
TABELA 8	Coeficiente de Distribuição de vário metais em HCl 0,1 molL^{-1} e acetona, variando a proporção de acetona (0-95%)	68
TABELA 9	Massa de Impurezas do eluato de ^{68}Ga	87
TABELA 10	Concentração de metais considerados impurezas presentes nos reagentes e na água usados no processo de purificação do ^{68}Ga	88
TABELA 11	Diferença do rendimento de purificação do ^{68}Ga em relação ao tipo de coluna utilizada.....	89
TABELA 12	Comparação entre o rendimento de purificação do ^{68}Ga e	

redução das impurezas entre duas diferentes resinas ativadas com ácido/base e apenas com ácido (n=3) 90

TABELA 13 Estudo das Resinas Catiônicas em Relação a Atividade de ^{68}Ga eluído em %, n=3 91

TABELA 14 Redução das impurezas contidas no eluato de ^{68}Ga após o processo de purificação de diferentes resinas catiônicas (n=3) 92

TABELA 15 Valores obtidos em relação a recuperação do ^{68}Ga e redução das impurezas químicas de cada processo de purificação do ^{68}Ga com a mesma resina catiônica AG50W-X4 (200-400 mesh) 93

TABELA 16 Valores de massa total (em µg) encontrada no eluato final (^{68}Ga) após a purificação na resina catiônica AG50W-X4 (200-400 mesh)..... 94

TABELA 17 Quantidade de ^{68}Ge (%) no eluato de ^{68}Ga após a purificação na resina catiônica AG50W-X4 (200-400 mesh) (n=3) 94

TABELA 18 Estudo das Menores Partículas das Resinas Catiônicas em Relação a Atividade de ^{68}Ga eluído em %, n=3 95

TABELA 19 Redução das impurezas químicas no eluato de ^{68}Ga após o processo de purificação realizado com as menores partículas de resinas catiônicas (n=3) 95

TABELA 20 Quantidade de ^{68}Ge (%) no eluato de ^{68}Ga (n=3) 96

TABELA 21 Comparação entre o processo de purificação do ^{68}Ga usando somente as menores partículas da resina catiônica AG50W-X8 (200-400) e a as partículas convencionais da mesma resina 96

TABELA 22 Comparação entre o processo de purificação do ^{68}Ga usando somente as menores partículas da resina catiônica AG50W-X4 (200-400) e as partículas convencionais da mesma resina 97

TABELA 23 Comportamento do ^{65}Zn na purificação do ^{68}Ga em resina catiônica AG50W-X4 (200-400 mesh) 98

TABELA 24 Comportamento do ^{65}Zn na purificação do ^{68}Ga em resina catiônica AG50W-X4 (200-400 mesh) 98

TABELA 25 Influência da adição de agente redutor na purificação do ^{68}Ga por extração por solventes em coluna cromatográfica 101

TABELA 26 Comportamento do ^{65}Zn na purificação do ^{68}Ga por extração por solventes em coluna cromatográfica 102

TABELA 27 Recuperação do ^{68}Ga em coluna microcromatográfica resina catiônica em meio básico 105

TABELA 28 Recuperação do ^{68}Ga em coluna microcromatográfica resina catiônica em meio básico – 3 experimentos 106

TABELA 29 Redução das impurezas químicas em coluna microcromatográfica resina catiônica em meio básico (n=3)..... 107

TABELA 30 Comparação dos resultados de pureza radioquímica da marcação do DOTATATO com ^{68}Ga em diferentes meios ... 108

LISTA DE ABREVIATURAS

Al_2O_3	Óxido de Alumínio
BHE	Barreira Hematoencefálica
BTS	Bis(tiosemicarbazona)
Bz-EDA-folato	Benzil-etillenodiamino – (γ) – folato
CCD	Cromatografia de Camada Delgada
CeO_2	Óxido de Cério
DIRF	Diretoria de Radiofarmácia
DOTA	Ácido 1,4,7,10–tetraazaciclododecano - 1,4,7,10–tetracético
DOTANOC	($DOTA^0$, 1-NaI^3) Octreotídeo
DOTA-RGD	Cis2-6; c[CH_2CO-Lis(DOTA)—Cis-Arg-Gli-Asp-Cis-Phe-Cys]-CCX_6-NH_2
DOTATATO	($DOTA^0$ – Tyr^3, Thr^8) Octreotídeo
DOTATOC	($DOTA^0$ – Tyr^3) Octreotídeo
DTPA	Ácido Dietilenotriaminopentacético
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra acético
FDA	*Food and Drug Administration*
Fe_2O_3	Óxido de Ferro
^{18}F-FDG	^{18}F-Fluordeoxiglicose
HBED-CC	N,N'-bis[2-hidroxi-5-(carboxiethil)benzil]etilenodiamina-N,N'-ácido diacético
HCl	Ácido Clorídrico
HNO_3	Ácido Nítrico
ICP - OES	Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Indutivamente Acoplado
LNH	Linfoma Não-Hodgkin

MAbs	Anticorpos Monoclonais
MAG_3	Mercapto Acetil Glicilglicilglicina
NaI	Iodeto de Sódio
NaOH	Hidróxido de Sódio
$Na^{99m}TcO_4$	Pertecnetato de Sódio
NCCN	*National Comprehensive Cancer Network*
NODAGA	1,4,7-triazaciclononane,1-ácido glutárico-4,7-ácido acético
NODAGATATO	1,4,7- Tricarboximetil-1,4,7-triazaciclononan-1-yl-acetil-D-Phe-Cis-Tyr-D-Trp-Lis-Thr-Cis-L-Thr (NODAGA-Tyr^3-Octreotato)
NOTA	Ácido 1,4,7-triazaciclononanetriacético
Octreoscan®	^{111}In-DTPA-octreotideo
OMS	Organização Mundial da Saúde
PET	Tomografia por Emissão de Pósitrons
PHR	Poliglicerol hiper-ramificado
Pirogalol	1,2,3 – benzenotriol
p-SCN-Bn-NOTA	S-2-(4-Isotiocianatobenzil)-1,4,7-triazaciclononane-1,4,7-ácido triacético
SnO_2	dióxido de Estanho
SPECT	Tomografia Computadorizada por Emissão de Fóton Único
$t_{1/2}$	tempo de meia vida
TC	Tomografia Computadorizada
TETA	Ácido 1,4,8,11- tetraazaciclotetradodecano – N,N”, N”’, N”” - tetracético
TiO_2	Óxido de Titânio
ZnO_2	Óxido de zircônio

1. INTRODUÇÃO

Radiofármacos são moléculas marcadas com radioisótopos usadas como traçadores radioativos em Medicina Nuclear, tano para diagnóstico como para terapia de diversas doenças. Estes radiofármacos são administrados via oral, intravenosa, intracavitária ou por inalação. Em geral, radiofármacos para diagnóstico são utilizados em concentrações muito baixas, de 10^{-6} a 10^{-8} $molL^{-1}$, dificilmente causando algum tipo de efeito adverso (Buchanan *et al*, 1995; Liu, 2004; Melero, 2008).

Nos últimos anos, a aplicação de biomoléculas marcadas com emissores de pósitrons tem crescido no campo da oncologia (Chinol *et al*, 2006), principalmente pelo uso estabelecido do traçador radioativo ^{18}F-Fluordeoxiglicose (^{18}F-FDG), uma molécula análoga da glicose marcada com o Flúor-18 (^{18}F, $t_{1/2}$= 109,6 minutos;β^+= 635 keV (97%), γ= 511keV; C.E. 3%) e usada no diagnóstico e na conduta preliminar de diversas doenças. O método de detecção dos radionuclídeos emissores de pósitrons é a Tomografia por Emissão de Pósitrons (PET) (Testanera e van den Broek, 2011)

A Tecnologia PET é um método não-invasivo que oferece informações sobre a função fisiológica do organismo, desde que seja aplicada uma molécula biologicamente ativa. A marcação de biomoléculas, tais como peptídeos, anticorpos monoclonais, oligonucleotídeos e glicoproteínas, com emissores de pósitrons promove um diagnóstico mais preciso, pois demonstra a presença de receptores em diversos tipos de tumores aliados com uma maior resolução e sensibilidade do PET em relação ao SPECT (Tomografia Computadorizada por Emissão de Fóton Único) (Tanaka e Fukasa, 2008).

Diversas biomoléculas têm sido marcadas com radioisótopos emissores de pósitrons, como por exemplo: elementos biogênicos (^{11}C, ^{13}N, ^{15}O), halogênios (^{18}F, ^{76}Br, ^{124}I) e os metais (^{68}Ga, ^{66}Ga, ^{64}Cu). Estes radionuclídeos possuem como característica básica um tempo de meia vida ($t_{1/2}$) física curta; por este motivo, o

processo de síntese de marcação até a aplicação clínica deve ser de acordo com este tempo. Também deve - se levar em conta o modo de decaimento, química favorável para o preparo do composto, o comportamento *in vivo*, a disponibilidade e o custo (Roesch e Riss, 2010; Velikyan, 2005).

Diversos trabalhos publicados na literatura apontam para o potencial uso de biomoléculas marcadas com ^{68}Ga ($t_{1/2}$ = 68 minutos) para exames de diagnóstico em PET. Este sucesso é devido ao desenvolvimento de um sistema eficiente do gerador de ^{68}Ge-^{68}Ga e sua purificação e a introdução do uso de agentes quelantes para tornar as ligações entre biomoléculas e metais (^{68}Ga) estáveis quando administradas *in vivo*.

2. OBJETIVO

Os objetivos deste trabalho são avaliar os métodos de purificação do $^{67/68}$Ga para a marcação de biomoléculas, com ênfase no estudo das impurezas químicas presentes nos radioisótopos primários, e desenvolver um método de purificação inédito.

A redução dos níveis de contaminantes provenientes do processo de produção de ambos os radionuclídeos ($^{67/68}$Ga) permite a marcação com biomoléculas com alta atividade específica, fornecendo um diagnóstico mais fidedigno.

3. JUSTIFICATIVA

A Diretoria de Radiofarmácia do IPEN-CNEN/SP tem como missão a produção e distribuição de radioisótopos e radiofármacos para uso em Medicina Nuclear. O uso do ^{18}F-FDG está estabelecido, visto o crescimento da produção e da demanda no Brasil. Existe um interesse pela classe médica nuclear brasileira em outros radiofármacos para exames PET, tanto de outras moléculas marcadas com ^{18}F como para novos radionuclídeos emissores de pósitrons. Entre eles se destaca o ^{68}Ga e, em particular, peptídeos marcados com ^{68}Ga.

A parte inédita deste trabalho é o desenvolvimento de novo método de purificação do ^{68}Ga para a marcação com biomoléculas, em particular do ^{68}Ga-DOTATOC e ^{68}Ga-DOTATATO.

4. REVISÃO DE LITERATURA

4.1- Gálio

O gálio é um elemento do grupo III da Tabela Periódica, está entre os elementos alumínio e índio. Possui dois isótopos naturais: ^{69}Ga (abundância de 60,1%) e ^{71}Ga (abundância de 39,9%). Existem três radioisótopos do gálio com propriedades ideais para serem utilizados em Medicina Nuclear. Dois deles podem ser usados em exames PET, o ^{66}Ga (β^+, $t_{1/2}$= 9,5 horas) e o ^{68}Ga (β^+, $t_{1/2}$= 68 minutos). O ^{67}Ga (C.E. e emissor γ, $t_{1/2}$= 78 horas) é usado em imagens de SPECT (Lederer, Hollander e Perlman, 1967; Velikyan, 2005)

4.1.1 – Histórico do Uso do Gálio Radioativo

Em 1931, o tartarato de gálio foi o primeiro composto a ser publicado com potencial terapêutico contra a sífilis em coelhos (Levaditi *et al*, 1931). Após 20 anos, o gálio radioativo, inicialmente o ^{72}Ga (β^-, $t_{1/2}$= 14 horas), foi usado no tratamento de diversos tipos de câncer (Brucer, Andrews e Bruner, 1951).

Em 1951, os autores Brucer, Andrews e Bruner publicaram um artigo relatando os problemas encontrados em terapia usando o gálio entre os anos de 1949 e 1951 no *Oak Ridge Institute of Nuclear Sciences* (EUA). Eles relataram o desconhecimento sobre a química, a física e a biologia do elemento gálio, já que seus isótopos são dificilmente encontrados na natureza. No entanto, eles estudaram a química do elemento, a biodistribuição em animais e humanos, a toxicidade, entre outros métodos.

Dentre 15 compostos químicos de gálio estudados, o citrato de gálio (^{72}Ga) provou ser o melhor. Os autores não fornecem dados detalhados sobre a irradiação do

alvo e a purificação e formas químicas do gálio que foram avaliadas (Brucer, Andrews e Bruner, 1951).

Os estudos de biodistribuição e toxicidade foram realizados em ratos, cachorros, suínos e humanos. Nos humanos, a terapia com ^{72}Ga foi testada em 34 pacientes com diversos tipos de câncer, principalmente sarcoma osteogênico com metástase nos pulmões ou plasmocitoma extramedular. O restante tinha tumor em tecidos moles e metástase óssea (Brucer, Andrews e Bruner, 1951).

O citrato de ^{72}Ga aparentemente se depositou imediatamente em áreas adjacentes ao tecido ósseo em reação ao tumor, o que na opinião dos autores, esta localização, quando uniforme, é excelente para terapia, porém a concentração nas vísceras ocorre vários dias após a administração do citrato de ^{72}Ga (Brucer, Andrews e Bruner, 1951).

Em relação à toxicidade, as doses aplicadas foram de 1,5 a 5,0 mg/ kg de citrato de ^{72}Ga duas vezes por semana. Os efeitos colaterais começaram a aparecer na terceira ou na quarta dose. Os sintomas foram mal-estar, anorexia, êmese e perda de peso maior que o esperado pela doença, além do decréscimo do número de leucócitos e hemoglobina. Todos estes efeitos poderiam ser amenizados com uma menor dose de radiação. Os autores não conseguiram distinguir a toxicidade do gálio carregador e do ^{72}Ga, mas acreditam que a toxicidade seja decorrente tanto do gálio carregador quanto da radiação do ^{72}Ga (Brucer, Andrews e Bruner, 1951).

Em relação ao ^{67}Ga, os autores sugerem que, apesar de ser o mesmo elemento químico, a energia é diferente e, por isso, são necessários mais estudos, principalmente, em relação à radiotoxicidade, já que a biodistribuição sugere que seja a mesma em relação ao ^{72}Ga (Brucer, Andrews e Bruner, 1951).

Entretanto, o ^{72}Ga era produzido em reator nuclear com baixa atividade específica e um $t_{1/2}$ física relativamente curto, o que não permitia estudos prolongados. Irradiaram um alvo de Zn de alta pureza em cíclotron e obtiveram o ^{67}Ga ($T_{1/2}$ – 78,3

horas). Estudos realizados em animais com o citrato de gálio (citrato de ^{67}Ga), mostrou que a captação óssea deste composto era inferior em relação ao ^{72}Ga-citrato ou gálio inativo (Bruner, Hayes e Parkinson, 1953).

Em 1969, Hartman e Hayes acreditavam que o citrato de ^{67}Ga poderia ser usado em estudos de imagens ósseas. Entretanto, em uma descoberta acidental, eles verificaram a concentração do ^{67}Ga em tumores de tecidos moles, o que fez o citrato de ^{67}Ga se tornasse uma das principais ferramentas de investigação de tumores em tecidos moles (Hartman e Hayes, 1969).

No início dos anos 70, os estudos com o gálio radioativo fizeram com que suas propriedades terapêuticas (^{72}Ga) fosssem elucidadas (Collery *et al*, 2002). O mecanismo proposto foi a similaridade dos raios iônicos do Ga^{3+} e Fe^{3+} (0,62 e 0,65 Å, respectivamente), os valores de eletronegatividade de Linus Pauling (1,6 e 1,8, respectivamente) e, consequentemente, o comportamento químico. Porém, o Ga^{3+} não é facilmente reduzido como o Fe^{3+}, por isso não sofre a mesma ação que o Fe^{3+} nas reações de redox. Estas características permitem que o gálio substitua o ferro em algumas proteínas, como a transferrina, onde ocorre a absorção celular do Ga^{3+} ao invés do Fe^{3+}. Isso ocorre, em particular, na proliferação de células cancerosas (Bandoli *et al*, 2009). Está postulado que o complexo gálio-transferrina se liga com maior probabilidade a sítios específicos de receptores da transferrina, na superfície ou no interior do tumor e, em seguida, o gálio se acumula no tumor, provavelmente, por difusão através da membrana da célula tumoral, internalizando-se no tumor, devido a mudanças de pH resultantes da diminuição da glicólise (Ballani *et al*, 2008). Além disso, o gálio liga-se a outras proteínas, como a ferritina e a lactoferrina levando a uma alta captação em áreas em que geralmente a concentração do ferro é maior (Pauwels *et al*, 1998).

4.1.2- Gálio-67

O ^{67}Ga decai 100% por captura eletrônica [$t_{1/2}$ – 78,3 horas; Eγ: 93 keV (40%), 184 keV (24%), 296 keV (22%), 388 keV (7%)] e está disponível na forma química de Citrato de Gálio pela Diretoria de Radiofarmácia (DIRF - IPEN-CNEN/SP). É produzido através do bombardeamento do alvo de zinco enriquecido (^{68}Zn) eletrodepositado em placa de cobre niquelada por prótons em cíclotron. Uma fina barreira de níquel é usada para prevenir a formação de ligas metálicas. Portanto, o Cu, o Ni e o Zn são considerados impurezas na solução final de ^{67}Ga (Brown *et al*, 1973).

4.1.2.1 – Uso Clínico do Gálio-67

O ^{67}Ga é administrado por via intravenosa na forma de citrato de gálio e imediatamente se liga à transferrina no sangue, assim localizando tumores, particularmente os linfomas que são mais ávidos. Muitos tumores possuem receptores de transferrina que se liga ao ^{67}Ga e facilita a incorporação aos lisossomos das células tumorais. Além disso, é um importante agente para a localização de focos de inflamação e infecção, por se ligar aos leucócitos (Alazraki, Shumate e Kooby; 2007).

Entretanto, o ^{18}F - FDG substituiu o uso do ^{67}Ga-citrato para estadiamento e detecção de linfoma recorrente, exceto em locais onde a tecnologia PET não está disponível. O uso do ^{18}F - FDG e do ^{67}Ga-citrato é recomendado pelo guia do *National Comprehensive Cancer Network* (NCCN) como parte do acompanhamento de pacientes com linfoma não-Hodgkin. Durante muitos anos, o citrato de ^{67}Ga desempenhou um papel importante no estadiamento de linfomas. De acordo com Alazraki, Shumate e Kooby (2007) é evidente que as imagens realizadas com ^{18}F - FDG são superiores às imagens realizadas com citrato de ^{67}Ga, porém o PET/CT não é uma realidade em muitos centros hospitalares. Além disso, o uso do ^{67}Ga -citrato não foi tão difundido

como o uso de ^{18}F - FDG. Ainda assim, é possível encontrar dados na literatura, similares aos dados encontrados em trabalhos publicados sobre ^{18}F - FDG, que mostram que o citrato de ^{67}Ga é um bom agente para a avaliação de resultados terapêuticos. A sensibilidade na avaliação inicial de linfoma de Hodgkin é de 86-92% e de 86-97% em linfoma não – Hodgkin (FIG. 1). A sensibilidade varia de acordo com a região da lesão, sendo 96% no tórax e 60-85% no abdome. Nesta região, a eliminação fisiológica do ^{67}Ga pelo cólon interfere nas imagens. Além disso, existem outros fatores relevantes para a realização deste exame, como: o tipo histológico, em que a sensibilidade é maior para linfoma de Hodgkin e linfoma de não – Hodgkin de grau intermediário/alto. O Fe^{3+} e o Ga^{3+} competem pelo mesmo sítio, por isso quando há um aumento da concentração de ferro no organismo pode ocasionar uma queda na sensibilidade, além dos casos falso-positivo em processos inflamatórios, outros tumores ou variações da distribuição fisiológica do ^{67}Ga (Alazraki, Shumate e Kooby, 2007; Sapienza, Buchpiguel e Hironaka, 2008).

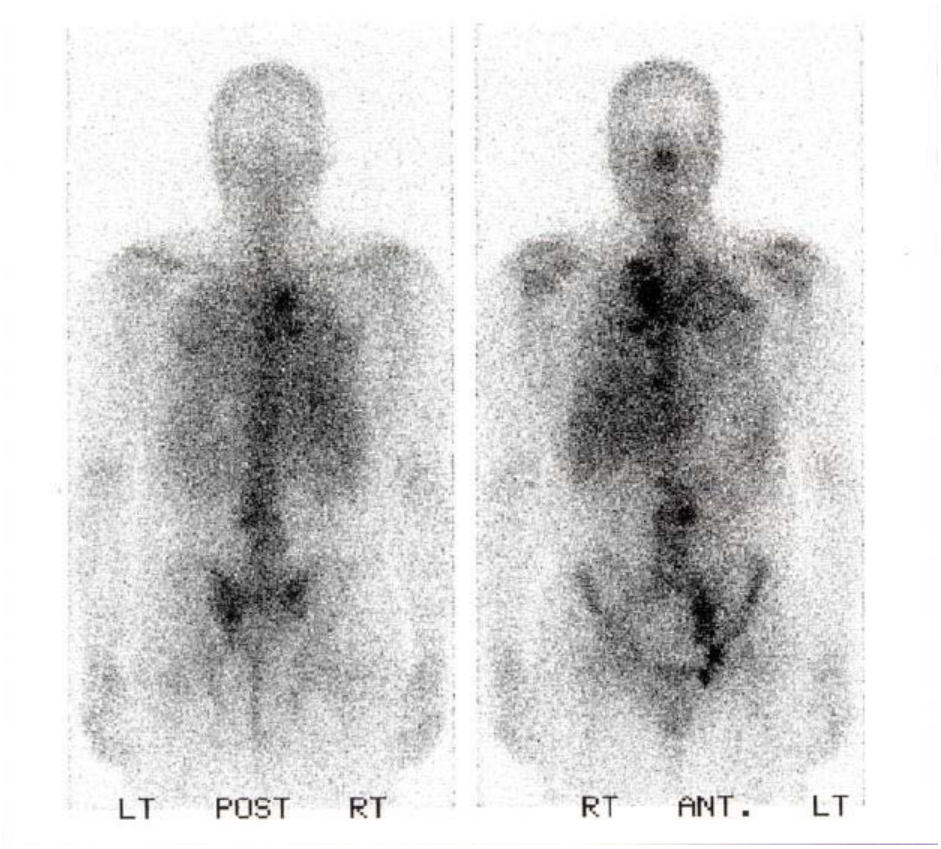

FIGURA 1 - Cintilografia com Citrato de ^{67}Ga em Paciente com Linfoma de Hodgkin (Sapienza, Buchpiguel e Hironaka, 2008)

4.1.2.2– Perspectivas do uso do Gálio-67

Apesar do uso do ^{67}Ga estar estabelecido na forma de citrato de gálio, ainda é um radioisótopo interessante para a marcação de outras moléculas, como mostram os trabalhos recentemente publicados na literatura (Müller *et al*, 2011; Saatchi *et al*, 2012), principalmente em estudos onde há a necessidade de se ter um tempo de meia vida mais longo em relação ao ^{68}Ga.

Müller *et al* (2011) investigaram as propriedades biológicas da molécula sintetizada com o agente quelante DOTA (ácido 1,4,7,10–tetraazaciclododecano - 1,4,7,10–tetracético) e benzil-etillenodiamino – (γ) – folato (DOTA-Bz-EDA-folato) e

marcada com ^{67}Ga. Esta molécula foi desenvolvida para marcações com radionuclídeos para SPECT (^{111}In, ^{67}Ga) e PET (^{68}Ga, ^{64}Cu) e para terapia (^{177}Lu, ^{67}Cu, ^{213}Bi).

Em células tumorais com a ativação dos macrófagos há uma super expressão dos receptores de folatos, associados com a expressão limitada em tecidos e órgãos normais, tornando a DOTA-Bz-EDA-folato, uma molécula promissora para diagnóstico e terapia de câncer e doenças inflamatórias (Low, Henne e Doorneweerd, 2008; Saga e Low, 2008). Em estudos pré-clínicos foi observado que o sucesso da aplicação de radiotraçadores de folatos depende de diversos fatores, entre eles, a estrutura química e a hidrofilicidade. Entretanto, há uma captação expressiva dos folatos, em particular, em conjugados hidrofílicos nos rins. A captação renal é dez vezes maior em relação à captação tumoral, devido à ligação específica de radiofolatos aos receptores de folato presentes na face luminal das células do túbulo proximal (Müller *et al*, 2009; Müller *et al*, 2011).

Neste estudo, foi investigado o desempenho do ^{67}Ga - DOTA-Bz-EDA-folato com a administração de diuréticos (manitol, hidroclorotiazida e furosemida), aminoácidos (glutamato e lisina) e pemetrexede (agente antineoplásico antifolato) com o objetivo de avaliar o comportamento renal frente a estas substâncias (Müller *et al*, 2011). O DOTA-Bz-EDA-folato (50mL, 10-3 molL^{-1}) foi marcado com ^{67}Ga (50-200 MBq) em solução tampão de acetato 0,4 molL^{-1}, pH 5. A pureza radioquímica foi superior a 98% (Müller *et al*, 2011).

A administração concomitante do ^{67}Ga - DOTA-Bz-EDA-folato e pemetrexede resultou em uma diminuição de 75% da captação renal. Na administração de aminoácidos, o glutamato apresentou um aumento da captação renal, enquanto que a lisina não apresentou um resultado positivo da captação renal, assim como os diuréticos usados neste estudo. A FIG. 2 mostra as imagens (SPECT/CT) realizadas após 4 horas da administração do ^{67}Ga - DOTA-Bz-EDA-folato. Foram realizadas imagens com camundongos com tumor, sendo um animal controle (A), um pré

administrado com o pemetrexede (B) e ao terceiro animal foi administrado acido fólico com o objetivo de bloquear os receptores de acido fólico. É possível visualizar o tumor apenas nos animais A e B nos quais receptores de folato não estão bloqueados (Müller *et al*, 2011).

FIGURA 2 - Imagens realizadas em SPECT/CT em camundongos com tumores xenotransplantados após 4h da administração de ^{67}Ga - DOTA-Bz-EDA-folato. A – camundongo controle; B- camundongo em que foi administrado o pemetrexede previamente; C- camundongo em que foi co-administrado ácido fólico (Müller *et al*, 2011)

A administração prévia do pemetrexede foi o estudo mais bem sucedido. Houve uma redução significativa da captação renal e uma boa captação tumoral. Os autores concluíram que este agente é ideal para tumores com a presença de receptores de folato e potencialmente para doenças inflamatórias, como artrite reumatóide, que envolvem receptores de folato ativo que expressam macrófagos (Müller *et al*, 2011).

Saatchi *et al* (2012) estudaram a toxicidade e a farmacocinética da molécula de poliglicerol hiper-ramificado (PHR), que possui uma biocompatibilidade similar ao polietilenoglicol, o que a torna um possível agente para liberação de drogas no local desejado (Kainthan e Brooks, 2007; Kainthan *et al*, 2007). O PHR é usado em muitos trabalhos *in vitro* e estudos de toxicidade em animais. Entretanto, neste trabalho esta molécula foi usada como um agente para imagens do *pool* cardíaco, para avaliar a função cardíaca contrátil. Normalmente, as hemácias do próprio paciente são marcadas com ^{99m}Tc para realizar esta função. No entanto, esta técnica possui diversas desvantagens, principalmente o risco de contaminação e o baixo rendimento de marcação (Saatchi *et al*, 2012).

O PHR (500 kDa) foi sintetizado com um agente quelante 1,4,7 – triazaciclononame – 1,4,7 – ácido triacético (NOTA) para obter uma melhor estabilidade quando marcado com o ^{68}Ga. A vantagem do NOTA é que a marcação é realizada rapidamente em temperatura ambiente (Velikyan *et al*, 2008). Entretanto, os autores usaram o ^{67}Ga ao invés do ^{68}Ga para os estudos, por possuir maior meia vida (Saatchi *et al*, 2012).

A marcação do complexo NOTA – PHR com $^{67}GaCl_3$ foi realizada em 10 minutos e a purificação foi realizada em coluna PD10 (Sephadex G-25M). A pureza radioquímica foi superior a 98%. O PHR não é biodegradável e, portanto, pode ter efeitos a longo prazo. Neste estudo, não foi constatado nenhum efeito de toxicidade até o sétimo dia. A FIG. 3 mostra a concentração do ^{67}Ga - NOTA – PHR no sangue de ratos durante 72

horas após injeção. O longo período de retenção do agente no sangue pode ser devido ao tamanho hidrodinâmico ser apenas em torno de 10nm de diâmetro.

Apesar desta molécula ter sido desenvolvida para a marcação com o ^{68}Ga pela facilidade de ser obtido através de um sistema de gerador de ^{68}Ge-^{68}Ga e apresentar excelentes resultados de marcação e biodistribuição. Os autores concluem que seria preferível um radioisótopo com um tempo de meia vida física compatível com o tempo de meia vida biológica do PHR (50,7 horas), ou seja, o ^{67}Ga, que também apresentou excelentes dados de marcação, com o objetivo de detectar, entre outras enfermidades, a hemorragia interna (Saatchi *et al*, 2012).

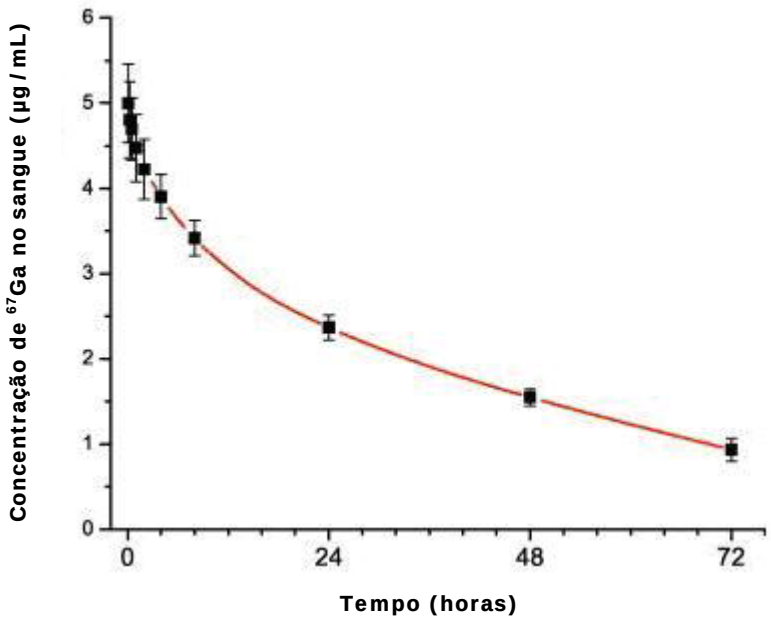

FIGURA 3 - Concentração de ^{67}Ga- NOTA – PHR no sangue de ratos, após a administração de 1mg do polímero e 1,2MBq de ^{67}Ga (Saatchi *et al*, 2012).

4.2- Sistemas de Geradores de Radionuclídeos usados em Medicina Nuclear

Um gerador de radionuclídeos é um dispositivo para se obter, através de uma separação efetiva de dois radionuclídeos, o radionuclideo “filho” formado através do decaimento do radionuclídeo “pai”, que possui uma $t_{1/2}$ física maior em relação ao radionuclídeo filho. Ambos atingem um equilíbrio radioativo ao longo de um determinado período. A finalidade é obter o radionuclideo filho com uma alta pureza química, radioquímica e radionuclídica. A principal vantagem do sistema de geradores é a disponibilidade de se ter o radionuclídeo pronto para o uso na própria clínica, o que significa que não é necessário ter um cíclotron ou um reator nuclear próximo à instalação para se ter o radionuclídeo rotineiramente. O radionuclídeo filho pode ser emissor de pósitron (β^+), gama (γ), beta (β^-) ou alfa (α) (Roesch e Filosofov, 2010; Suzuki, 2009).

Por razões práticas, a maioria dos geradores que são usados em aplicações médicas tem como uma das características o equilíbrio secular entre o par de radionuclídeos, em que o $t_{1/2}$ física do elemento pai é significantemente maior que o $t_{1/2}$ física do elemento filho (em torno de 100 vezes), permitindo que se possa realizar separações repetidas entre os pares de radionuclídeos (TAB. 1) (Roesch e Filosofov, 2010).

TABELA 1 - Sistema de Geradores de Radionuclídeos com Equilíbrio Secular

Sistema de Gerador	**Radionuclídeo Pai**		**Radionuclídeo Filho**		
	$T_{1/2}$	**Decaimento***	**$T_{1/2}$**	**Decaimento**	**Aplicação**
$^{44}Ti/^{44}Sc$	47,3 anos	CE*	3,93 horas	β^+	PET
$^{68}Ge/^{68}Ga$	270,8 dias	CE	68 min.	β^+	PET
$^{82}Sr/^{82}Rb$	25,6 dias	CE	1,27 min.	β^+	PET
$^{90}Sr/^{90}Y$	28,5 anos	β^-	2,67 dias	β^-	Terapia
$^{188}W/^{188}Re$	69,4 dias	β^-	17 horas	β^-	Terapia

* CE – Captura Eletrônica

Entretanto, existe uma exceção, o gerador de $^{99}Mo/^{99m}Tc$, em que o $t_{1/2}$ do radionuclídeo pai, no caso, o ^{99}Mo é apenas 66 horas e a do radionuclídeo filho, o ^{99m}Tc, 6,02 horas. Neste tipo de gerador, o equilíbrio é transiente, ilustrado na FIG. 4 (Suzuki, 2009).

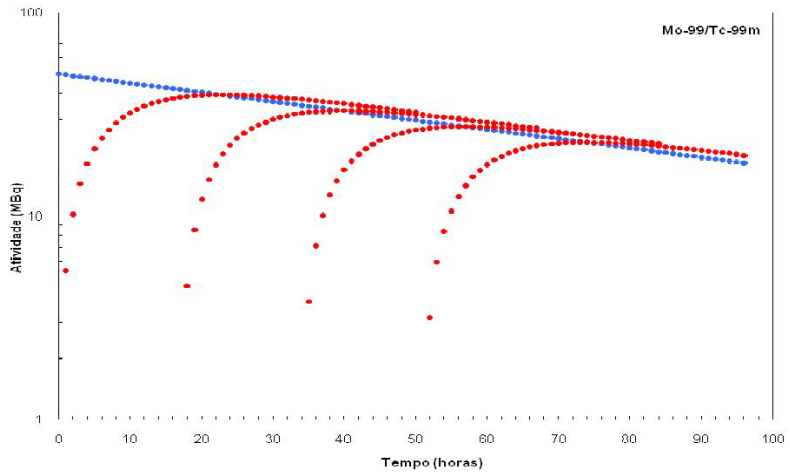

FIGURA 4- Curva de decaimento e crescimento do gerador de $^{99}Mo/^{99m}Tc$ em equilíbrio transiente (Suzuki, 2009)

4.2.2- Gerador de ^{68}Ge-^{68}Ga

Geradores de radionuclídeos representam uma estratégia de custo benefício. O radionuclídeo filho pode ser obtido no momento em que será utilizado, com alta atividade específica e livre de carregadores. Esta vantagem se aplica, principalmente, para radionuclídeos que possuem um $t_{1/2}$ curto, assim não sendo necessária uma instalação de produção de radioisótopos próxima à radiofarmácia hospitalar e, além disso, o $t_{1/2}$ física de apenas 68 minutos não é adequado para ser transportado para longas distâncias (Roesch e Filosofov, 2010).

O uso de gerador de ^{68}Ge-^{68}Ga tem um grande interesse em medicina nuclear, principalmente em aplicações PET, devido ao grande potencial da marcação de moléculas com ^{68}Ga. Roesch e Filosofov (2010) acreditam que este sistema de geradores terá um impacto em diagnóstico em PET assim como o gerador de ^{99}Mo/^{99m}Tc teve no uso do SPECT. Os geradores de ^{68}Ge-^{68}Ga estão sendo desenvolvidos para produzir eluatos adequados para a marcação de moléculas, sem a necessidade de purificação prévia. Existem muitos peptídeos sintetizados com o agente quelante DOTA que podem ser marcados com o ^{68}Ga, além de outros agentes quelantes que vêm sendo desenvolvidos (item 4.3.1) (Breeman *et al*, 2011).

O interesse em produzir o radioisótopo ^{68}Ga se deve às suas excelentes características físicas de decaimento, possui um $t_{1/2}$ física adequado para a realização de imagens ($t_{1/2}$ = 68 minutos) é emissor de pósitron (β^+ = 89%, $E_{\beta+max}$ = 1,92 MeV), possui uma baixa emissão de fótons (1077 keV, 3,2%) e decai para o ^{68}Zn estável (Zhernosekov, 2006) (FIG. 5).

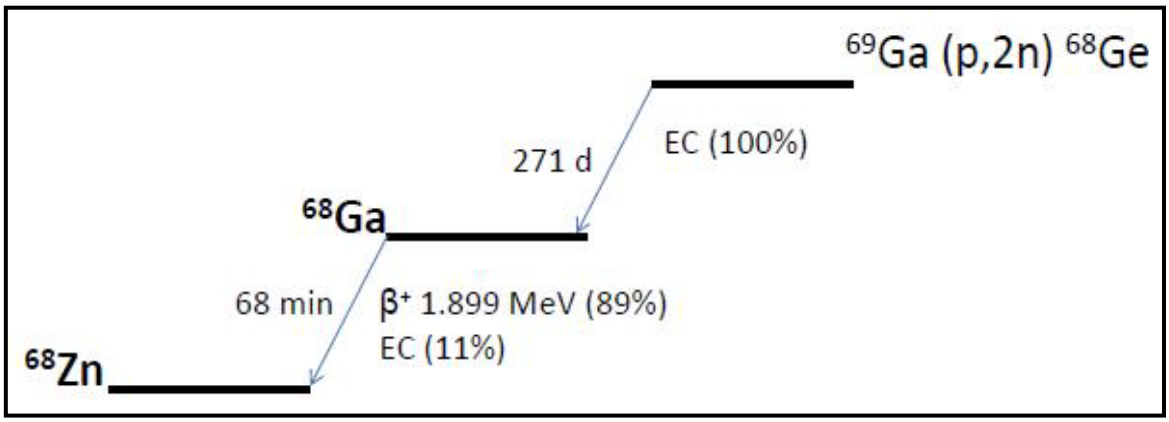

FIGURA 5 – Esquema de decaimento do ^{68}Ge

4.2.2.1- Produção do ^{68}Ge

O ^{68}Ge é produzido em um acelerador através de uma variedade de reações nucleares (TAB. 2). No entanto, a principal reação nuclear para a produção de ^{68}Ge é a (p,2n) em alvos de gálio (Mirzadeh e Lambrecht, 1996), mas, devido ao longo tempo de meia vida do ^{68}Ge, é necessário um acelerador de alta potência para se obter uma quantidade suficiente de ^{68}Ge com um bom rendimento de produção (Roesch e Riss, 2010; Zhernosekov, 2006).

TABELA 2 - Reações Nucleares mais Relevantes para a Produção de ^{68}Ge (Roesch e Riss, 2010)

Partícula	**Alvo**	**Reação Nuclear**
Próton	^{69}Ga	(p,2n)
Próton	^{nat}Ga (^{69,71}Ga)*	(p,*x*n) *x*=2,4
Próton	^{nat}Ge	(p,p*x*n)
Próton	^{75}As, ^{79,81}Br, ^{85,87}Rb	(p,*x*n*y*p), *y* = 2, 4, 6,...
Dêuteron	^{69}Ga	(d,3n)
Hélio – 4 (α)	^{66}Zn	(α,2n)
Hélio - 3	^{66,67,68}Zn	(^{3}He,*x*n), *x* = 1, 2, 3

* Nat: Natural

O crescimento teórico do ^{68}Ga a partir do ^{68}Ge em um sistema de gerador de ^{68}Ge-^{68}Ga está representado na FIG. 6. Após 68 minutos da eluição do gerador, 50% da atividade máxima do ^{68}Ga é alcançada e, após 4 horas, este valor aumenta para >90% (Breeman *et al*, 2011).

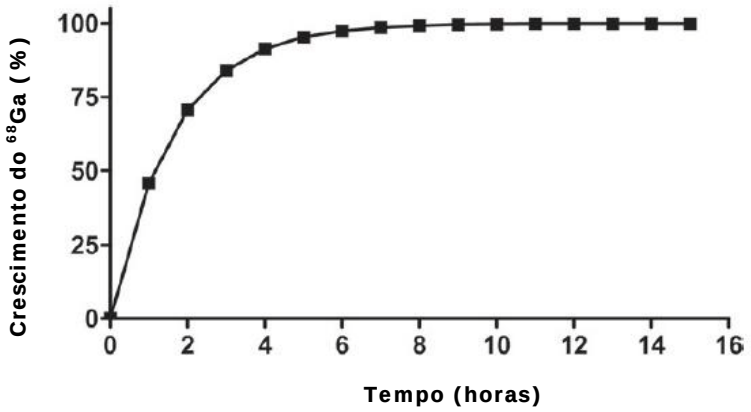

FIGURA 6 - O crescimento teórico do ^{68}Ga a partir do decaimento do ^{68}Ge (Breeman *et al*, 2011).

4.2.2.2- Evolução dos Geradores de ^{68}Ge-^{68}Ga

Os geradores de ^{68}Ge-^{68}Ga vem sendo estudados há mais de 50 anos. Greene e Tucker (1961) descreveram um sistema de gerador de ^{68}Ge-^{68}Ga em que a coluna cromatográfica de óxido de alumínio (Al_2O_3) ou zircônio era carregada com o ^{68}Ge. O ^{68}Ga era eluído em uma solução de EDTA (ácido etilenodiaminotetracético) 0,005 $molL^{-1}$ em pH neutro com baixa contaminação de ^{68}Ge (<0.01%). O ^{68}Ga-EDTA era usado diretamente como agente para imagens cerebrais (Shealy, Arrow e Brownell, 1964; Pozzili *et al*, 1988).

O objetivo do trabalho de Pozzilli *et al* (1988) foi elucidar o uso clínico do ^{68}Ga-EDTA e PET no estudo das anormalidades da barreira hematoencefálica (BHE) associada à esclerose múltipla. O sucesso do uso do ^{82}Rb-EDTA em humanos para medida da permeabilidade da BHE já havia sido descrita por outros autores (Brooks *et al*, 1984; Lammertsma *et al*, 1984). Em 4 pacientes de um total de 15 pacientes com esclerose múltipla, sendo 3 homens e 12 mulheres com idade entre 17-51 anos, foram detectados o acúmulo de ^{68}Ga-EDTA em regiões patológicas. A FIG. 7 mostra que, em uma paciente com hemiparesia esquerda, o PET mostrou evidentemente as lesões bilaterais. A extensão e a localização das áreas anormais do PET foram correspondentes às áreas mostradas na Tomografia Computadorizada (TC). Em outro paciente foi realizada uma sequência dinâmica (PET) (FIG. 8), mostrando as áreas de captação aumentada pelo ^{68}Ga -EDTA.

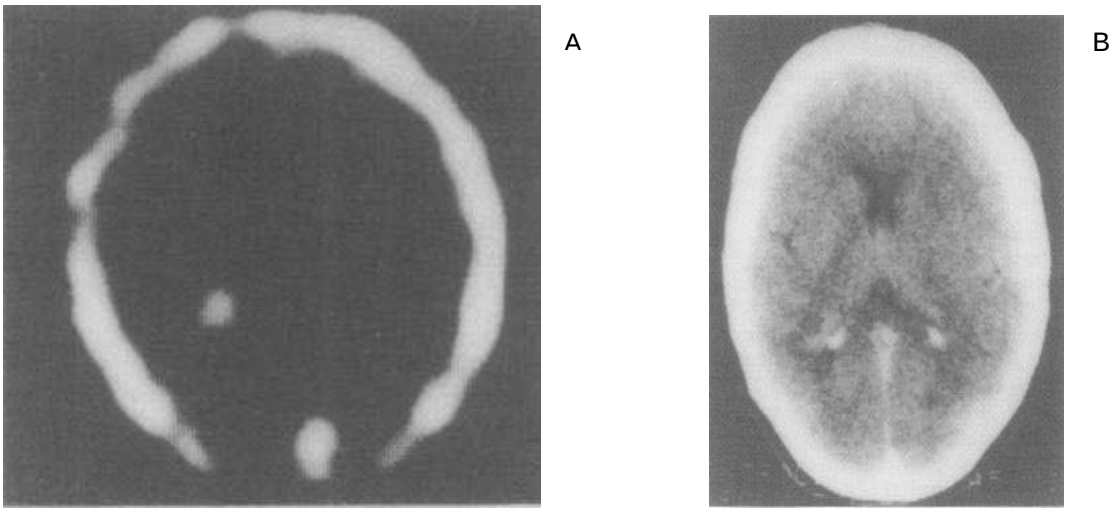

FIGURA 7 - Imagem de PET (A) realizada com ^{68}Ga -EDTA e CT (B) de um paciente com esclerose múltipla (Pozzilli *et al*, 1988)

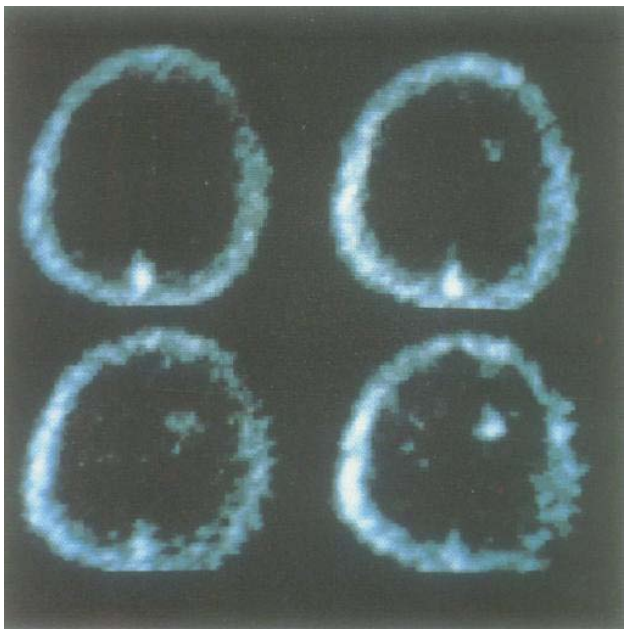

FIGURA 8- Imagens seqüenciais obtidas a 20, 40, 60 e 80 minutos após a administração intravenosa do ^{68}Ga -EDTA. Áreas focais de captação aumentada do traçador são mostradas em ambos, no hemisfério direito (imagens iniciais) e no hemisfério esquerdo (imagens tardias) (Pozzilli *et al*, 1988)

Os autores sugerem que o problema de adquirir as imagens separadamente, principalmente as imagens dinâmicas (FIG. 8), pudesse ser resolvido através de uma tecnologia adequada de imagens híbridas, ou seja, a possibilidade de se realizar as imagens da TC simultaneamente com as imagens do PET, que fornecem dados quantitativos da permeabilidade da BHE que podem ser associados a dados anatômicos fornecidos pela TC (Pozzilli *et al*, 1988).

O ^{68}Ga- EDTA geralmente deve ser decomposto em um complexo menos estável que remova o EDTA livre antes de prepará-lo para a marcação de uma molécula. Diversos métodos foram publicados: a precipitação do ^{68}Ga (Yano e Anger, 1964), extração por solvente (Hayes, Calton e Byrd, 1965), adição de ferro ou gálio como carregador (Andrews, Kniseley e Wagner, 1966; Colombetti e Goodwin, 1969) e decomposição térmica (Weber *et al*, 1969). Apesar disto, o melhor método, segundo Green e Welch (1989), é a técnica de troca iônica, em que o complexo de EDTA é hidrolisado em ácido clorídrico (HCl) para $^{68}GaCl_4^-$, que é absorvido em uma resina de troca aniônica. Após a lavagem para remover o EDTA livre, o ^{68}Ga é eluído com HCl. A desvantagem do sistema de gerador é a contaminação do eluente com Al^{3+} e a deterioração da eficiência de eluição com o passar do tempo (Raino, Skraba e Kramer, 1978).

Foram desenvolvidos outros tipos de geradores de ^{68}Ge-^{68}Ga, em que havia a separação do ^{68}Ga do ^{68}Ge, através da complexação com outros agentes complexantes. Arino, Skraba e Kramer (1978) desenvolveram um gerador de ^{68}Ge-^{68}Ga em que o ^{68}Ge era retido em ácido poliantimônico e o ^{68}Ga era eluído em uma solução de oxalato de sódio 2%. A recuperação do ^{68}Ga foi de (80 ± 10)% e a pureza radionuclídica foi >99%. Neirincky e Davis (1980) usaram uma coluna de troca aniônica usando ácido fluorídrico 0,01 $molL^{-1}$ como eluente, o que permitiu uma separação com alta pureza devido à diferença significativa dos coeficientes de distribuição dos elementos. Após a neutralização, a concentração de NaF era

considerada biologicamente segura. A quantidade de ^{68}Ge presente no eluato foi reduzida para $<10^{-4}$ após mais de 600 eluições e o rendimento de ^{68}Ga era > 90%. Apesar disso, em todos estes geradores desenvolvidos, não era possível realizar marcações de outras moléculas, pois o ^{68}Ga não se encontrava na forma iônica (Ga^{3+}) (Zhernosekov, 2006).

Por isso, foram desenvolvidos geradores de ^{68}Ge-^{68}Ga em que o eluato apresentava o gálio na forma livre ($^{68}Ga^{3+}$), sem agentes complexantes. Nestes casos, o ^{68}Ge foi absorvido em matrizes inorgânicas, como: alumina (Al_2O_3), óxido de ferro (Fe_2O_3) (Kopecký, Mudrová e Svoboda, 1974; Kopecký e Mudrová, 1974); óxido de estanho (SnO_2), óxido de zircônio (ZnO), óxido de Titânio (TiO_2) (Loc'h, Maziere, Comar, 1980) e óxido de Cério (CeO_2) (Bao e Song, 1996).

O Ge (IV) forma um complexo estável com grupos fenólicos e sua adsorção ocorre em resina de 1,2,3 – benzenotriol (pirogalol) - formaldeído (Schumacher e Maier-Borst, 1981). Esta resina mostrou ser resistente à dissociação causada pelos efeitos da radiação. O rendimento de eluição do ^{68}Ga foi em torno de 75% durante um período de 250 dias e a quantidade de Ge foi inferior a 1μg/mL. Nakayama *et al* (2003) desenvolveram um gerador usando polímero orgânico tendo como grupo adsorvente a N-metilglucamina para o ^{68}Ge. O ^{68}Ga foi eluído em uma solução que possui baixa afinidade por quelatos de gálio, como o ácido cítrico ou fosfórico. A contaminação de ^{68}Ge foi inferior a 10^{-4}%. Estes geradores também não se tornaram comercialmente disponíveis.

Somente em 2001, a empresa *Cyclotron Co. Ltd.* (Rússia) começou a produzir e comercializar um gerador de $^{68}Ge/^{68}Ga$. Este gerador possui uma coluna de vidro contendo ^{68}Ge adsorvido em uma matriz de titânio. Esta coluna é hermeticamente selada e colocada em uma blindagem. É caracterizado pela eluição do ^{68}Ga na forma iônica em HCl 0,1 $molL^{-1}$. Entretanto, este gerador não é projetado para a aplicação direta *in vivo*. No eluato há a presença de contaminantes, como por exemplo: o ^{68}Ge

(radionuclídeo pai que possui $t_{1/2}$ longa); o Ti (proveniente da coluna), o Zn (produto de decaimento do ^{68}Ga e comumente encontrado em reagentes) e o Fe (a química de coordenação do Fe é semelhante ao Ga e é encontrado em reagentes e mesmo em água purificada).

Além da empresa russa, outras empresas desenvolveram geradores de $^{68}Ge/^{68}Ga$. As empresas *Cyclotron Co Ltd*. (2011) e *Eckert and Ziegler* (2011) possuem a mesma tecnologia de geradores à base de TiO_2, em que é necessária a purificação do eluato após a o processo de eluição. Já a *iThemba* (2011) desenvolveu o gerador de ^{68}Ge-^{68}Ga, em que o ^{68}Ge é adsorvido em uma coluna de dióxido de estanho (SnO_2) e o ^{68}Ga é eluído em HCl 0,6 $molL^{-1}$. Na TAB. 3 estão expressas as impurezas do gerador de ^{68}Ge-^{68}Ga após diversas eluições. O peptídeo DOTATATO (50 µg em solução tampão de acetato de sódio) foi diretamente marcado com eluato contendo ^{68}Ga. O tempo de reação foi de 20 minutos (90-95ºC) e a eficiência de marcação foi 97% após 3 dias sem eluir o gerador de ^{68}Ge-^{68}Ga (Rossouw e Breeman, 2012).

TABELA 3- Concentração de metais (em $\mu g.mL^{-1}$) no eluato de ^{68}Ga do gerador de ^{68}Ge-^{68}Ga proveniente da empresa *iThemba* em relação ao tempo de uso (Rossouw e Breeman, 2012)

Tempo	**Concentração ($\mu g.mL^{-1}$)**					
	Zn	**Fe**	**Sn**	**Ti**	**Cu**	**Al**
1 mês	1,33	0,24	0,24	0,08	0,02	0,72
6 meses	1,11	0,25	0,19	0,07	0,02	0,74
12 meses	1,08	0,11	0,14	0,05	0,02	1,28

A empresa *ITG Isotope Technologies Garching* (2011) comercializa o gerador de $^{68}Ge/^{68}Ga$ (FIG. 9), em que o elemento pai é adsorvido em uma matriz orgânica (Sílica adsorvida com dodecil-3,4,5 - trihidroxi benzoato) e o ^{68}Ga eluído em HCl 0,05 $molL^{-1}$.

A vantagem desta tecnologia é que não é necessário passar pelo processo de pré-concentração e purificação após a eluição. Entretanto, esta tecnologia necessita ainda de validação. A TAB. 4 sumariza alguns dados dos geradores de ^{68}Ge-^{68}Ga comerciais existentes.

TABELA 4 - Geradores de $^{68}Ge/^{68}Ga$ comerciais

Empresa	**Origem**	**Matriz da Coluna**	**Eluente**	**Rendimento de Eluição**
Cyclotron Co Ltd.	Rússia	TiO_2	HCl 0,1 mol.L^{-1}	60-75%
Eckert and Ziegler	Alemanha/EUA	TiO_2	HCl 0,1 mol.L^{-1}	70-75%
iThemba (IDB)*	África do Sul	SnO_2	HCl 0,6 mol.L^{-1}	80%
ITG	Alemanha	Sílica/Orgânica	HCl 0,05 mol.L^{-1}	>80%

* Gerador de $^{68}Ge/^{68}Ga$ fabricado pela iThemba e comercializado pela empresa IDB

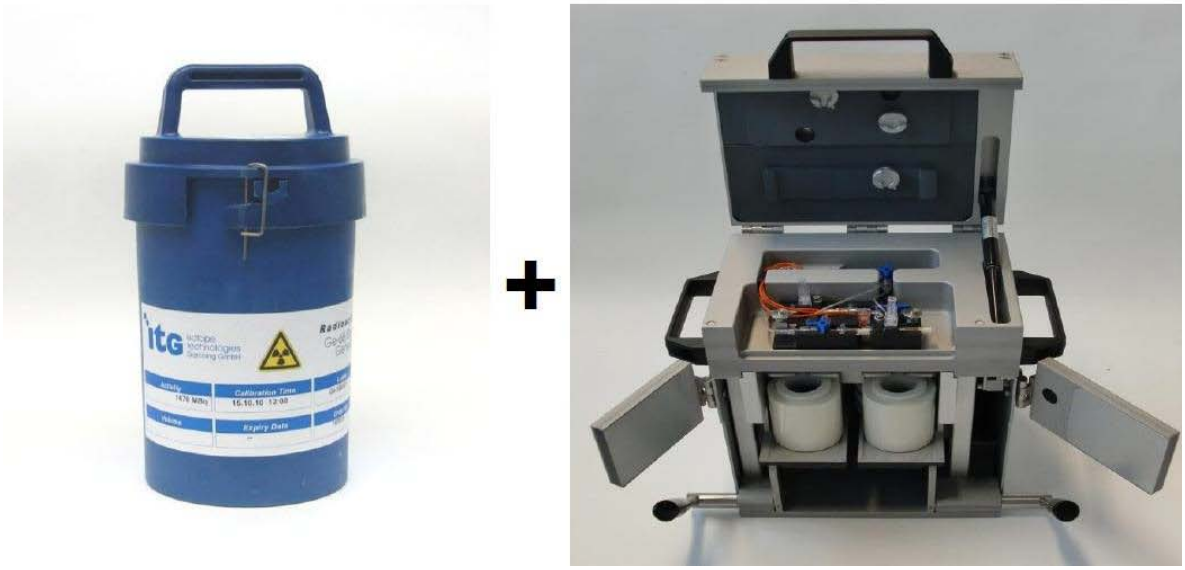

FIGURA 9 - Sistema de gerador de ^{68}Ge-^{68}Ga e o módulo de síntese *IQS® ^{68}Ga Fluidic Labeling System* comercializado pela empresa *ITG Isotope Technologies Garching*

Chakravarty *et al* (2010) desenvolveram um gerador de ^{68}Ge-^{68}Ga (10mCi/370 MBq) para a marcação direta, sem a necessidade de purificação prévia ou mesmo a necessidade de adição de soluções para aumentar o pH do eluato. Eles utilizaram o complexo nanocristalino de poliacrilonitrilo de cério como material sorvente. Mais de 95% do ^{68}Ga é eluído em solução de HCl 0,01 molL^{-1} (FIG. 10). Após 7 meses o rendimento decai para (82±5)%, sem qualquer degradação no sistema. A presença de ^{68}Ge no eluato de ^{68}Ga foi inferior a 10^{-5}% após 7 meses de uso e as impurezas químicas (Ce, Fe, e Mn) foram inferiores à 0,1 µg.mL^{-1}. O peptídeo DOTATATO [(DOTA^0 – Tyr^3, Thr^8) Octreotídeo] (25 µg em solução tampão de acetato de amônio) foi diretamente marcado com o eluato contendo ^{68}Ga (15 minutos, 90ºC). O rendimento de marcação foi superior a 99%.

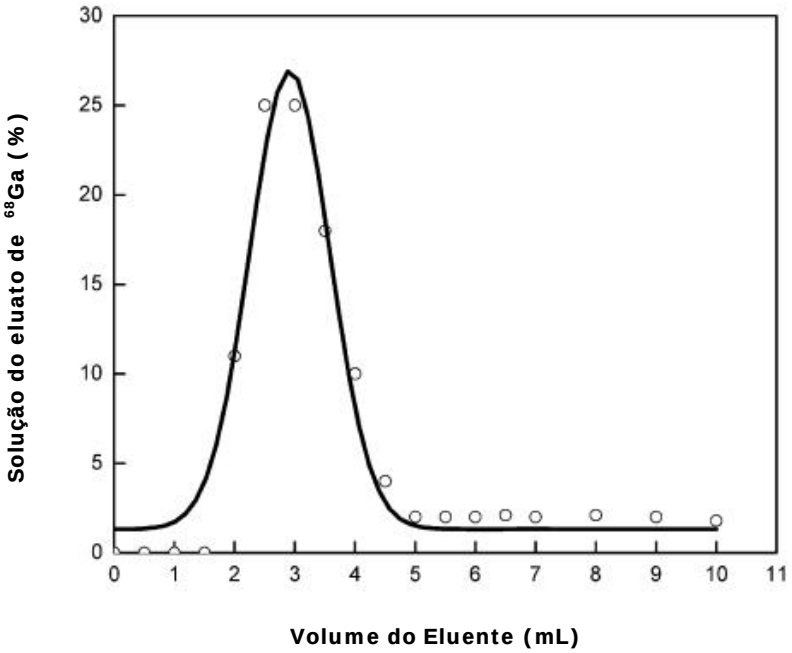

FIGURA 10 - Perfil de Eluição do Gerador de ^{68}Ge-^{68}Ga desenvolvido por Chakravarty *et al* (2010) com HCl 0,01 molL^{-1} em fluxo de 1 mL/min

Apesar da tecnologia destes geradores de $^{68}Ge/^{68}Ga$ ter avançado com sucesso nestes últimos 50 anos, a vida útil é reduzida, entre 6 meses e 1 ano. Depois deste período, a quantidade de ^{68}Ge aumenta no eluato, e há a redução da eficiência de eluição dos geradores.

A disponibilidade do gerador de ^{68}Ge-^{68}Ga estimula outras aplicações em PET, pois permite um custo benefício favorável da produção de radiotraçadores de ^{68}Ga, não sendo necessário uma instalação de um cíclotron próximo. Além disso, permite o uso de traçadores mais sofisticados com o uso dos agentes quelantes sintetizados com biomoléculas, como o DOTA/NOTA (ácido 1,4,7-triazaciclononanetriacético)sintetizado com análogos da somatostatina (Win *et al*, 2006) ou ainda kits podem ser disponíveis para marcar com ^{68}Ga que teriam um grande impacto em imagens moleculares através da tecnologia PET (Fani, Andre e Maecke, 2008).

4.2.2.3– Purificação e Concentração do Eluato de ^{68}Ga

A maior limitação do uso direto do eluato de ^{68}Ga proveniente dos principais geradores de $^{68}Ge/^{68}Ga$ comerciais, ou seja, das empresas *Cyclotron Co Ltd*. e *Eckert and Ziegler* (5-7mL de HCl 0,1 $molL^{-1}$), para a marcação direta de biomoléculas, como ^{68}Ga-DOTA-peptídeos é o grande volume do eluato (~7mL) em HCl $molL^{-1}$, a alta concentração de íons H^+, a quantidade de ^{68}Ge presente no eluato e a presença de outros contaminantes metálicos, como Fe, Zn e Ti. Apesar da concentração destes metais ser considerada baixa (sub-partes por millhão), ela pode ser maior quando comparada com a concentração de ^{68}Ga. Se por exemplo, a concentração dos seguintes metais: Zn^{2+}, Sn^{4+}, Ti^{4+} e $Fe^{2+/3+}$ for 1 $\mu g.mL^{-1}$ cada para 10mCi (370MBq) de ^{68}Ga em 6mL de HCl 0,1 $molL^{-1}$, as relações átomo-grama seriam expressas em aproximadamente 1000, 1250, 2500 e 2500, respectivamente (Breeman *et al*, 2011).

De acordo com Zhernosekov *et al* (2007), o Fe é o principal contaminante e compete diretamente com o ^{68}Ga na ligação com o DOTA, um importante agente quelante usado para a marcação de biomoléculas com metais, bem como o Zn^{2+} pois pode formar complexos estáveis em pH 2-8. Portanto, estes contaminantes não permitem que se atinja o valor máximo de rendimento e atividade específica na marcação de peptídeos, por exemplo.

Entretanto, Pourbaix, Zhang e Pourbaix (1997) publicaram que o Fe^{3+} é pouco presente, pois o Fe^{2+} é o estado de oxidação estável em meio ácido, e este não é forte competidor nas reações químicas como o Fe^{3+}, na complexação com o DOTA, em pH 3-5 (Breeman *et al*, 2003; Breeman *et al*, 2005). Esta situação é diferente em meio neutro e básico (Pourbaix, Zhang e Pourbaix, 1997).

A presença de Ti^{4+}, proveniente da coluna do gerador de ^{68}Ge-^{68}Ga (TiO_2) é considerada irrelevante, pois este metal não compete com o ^{68}Ga na incorporação do DOTA, por exemplo (Breeman *et al*, 2011).

O Ge se liga às proteínas plasmáticas no sangue e é rapidamente eliminado pela urina e fezes, sendo que a principal via de excreção é a via renal. A conclusão deste estudo é que o Ge não se deposita em um órgão específico, mas é amplamente distribuído entre todos os órgãos. Não foi observada a acumulação deste metal em nenhum tecido, mesmo após a aplicação de várias doses semanais, não apresentando toxicidade e é apontado como um metal biologicamente inerte (Bauwens *et al*, 2010; Rosenfeld, 1954).

A fim de reduzir o nível de impurezas, é necessária a purificação do eluato após a eluição do gerador de ^{68}Ge-^{68}Ga. O eluato de ^{68}Ga ideal para marcar outras moléculas em medicina nuclear, tem que estar em solução com volume reduzido e livre de contaminantes químicos e radioquímicos.

Dados da literatura indicam que, com o aumento do teor de acetona em solução ácida, há uma diminuição da afinidade do gálio por uma resina catiônica. Baseado

neste conceito, Zhernosekov *et al* (2007) elaboraram um processo de pré-concentração e purificação em que se usa uma microcromatografia em coluna, usando a resina catiônica, para realizar a purificação do ^{68}Ga após a eluição do gerador ^{68}Ge-^{68}Ga em HCl 0,1 molL^{-1}. A recuperação do ^{68}Ga ocorre em uma solução de acetona/HCl, mostrando que este método é simples, rápido e quimicamente eficiente na remoção das seguintes impurezas: Ge, Fe, Zn e Ti e na pré-concentração, já que o volume inicial do eluato era de 7mL de HCl 0,1 molL^{-1} e passou para 400µL de uma mistura de acetona/HCl 0,05 molL^{-1} (98/2)%. Posteriormente, o DOTATOC [(DOTA^0 – Tyr^3) Octreotídeo] (7-14 nmol) foi adicionado ao eluato contendo ^{68}Ga, na presença de 4-4,5 mL de água e aquecido a 98ºC durante 10 minutos. O rendimento radioquímico foi superior a 95% e a pureza radioquímica superior a 99,5%. A empresa *Eckert and Ziegler Isotopes Products* (Alemanha/EUA) acoplou um módulo automático de purificação ao gerador de ^{68}Ge-^{68}Ga baseado neste método.

Velikyan (2005) estudou a eficiência de 3 geradores de ^{68}Ge-^{68}Ga *Cyclotron Co Ltd*.) que foram avaliados durante um período superior a 2,5 anos. A eficiência de eluição era (78±5)% durante o primeiro mês de uso, após 29 meses a eficiência de eluição decresceu lentamente para (41±3)%.

Além disso, foi estudada a possibilidade da marcação de biomoléculas com ^{68}Ga sem uma purificação prévia do eluato de ^{68}Ga proveniente do gerador de ^{68}Ge-^{68}Ga, apenas reduzindo o volume de eluição. O eluato foi dividido em 7 partes, sendo que a primeira fração corresponde a 0,3mL e a segunda a 0,7mL e as frações restantes correspondem a 1mL de eluato. A FIG. 11 mostra que a fração 3 contém 60% do total de atividade de ^{68}Ga. O perfil de eluição do ^{68}Ga e da contaminação de ^{68}Ge são similares, sendo que a contaminação de ^{68}Ge foi ~10^{-3}% da atividade total (Velikyan, 2005).

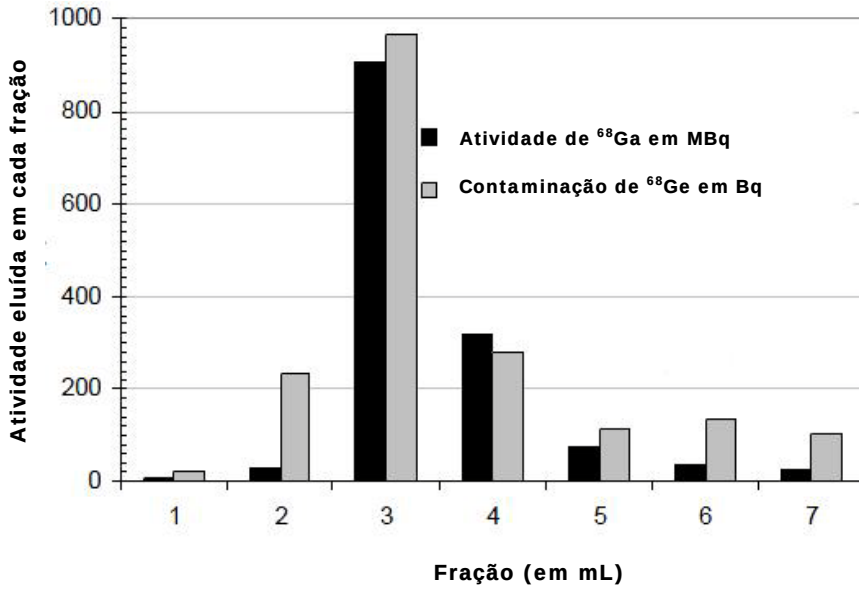

FIGURA 11 – Perfil de eluição do gerador de ^{68}Ge-^{68}Ga (Velikyan, 2005)

O rendimento de marcação do DOTATOC (5nmol) com ^{68}Ga obtido diretamente do gerador de ^{68}Ge-^{68}Ga (1mL em HCl 0,1 molL^{-1}) foi >95%. Entretanto, a grande desvantagem deste método é que cerca de 40% da atividade total de ^{68}Ga foi perdida durante o procedimento de marcação. Por isso, foi estudado um novo método de purificação do ^{68}Ga (Velikyan, 2005).

A pré-concentração e a purificação do eluato foram realizadas em resina aniônica. Foram testados a resina aniônica AG 1X-8 (Bio-Rad, EUA) e o cartucho Chromafix SAX SPEC (45mg de resina, Macharey-Nagel). Os resultados em relação à retenção, recuperação do ^{68}Ga e o perfil de eluição foram semelhantes. Entretanto, o cartucho Chromafix SAX SPEC é um produto comercializado pela Macharey-Nagel, o que o torna mais apropriado para uma futura padronização do método e automatização do sistema. A FIG. 12 mostra o coeficiente de distribuição de ^{68}Ga em relação à concentração de HCl, sendo que a adsorção do ^{68}Ga em HCl no cartucho Chromafix SAX SPEC aumentou com o aumento da concentração de HCl.

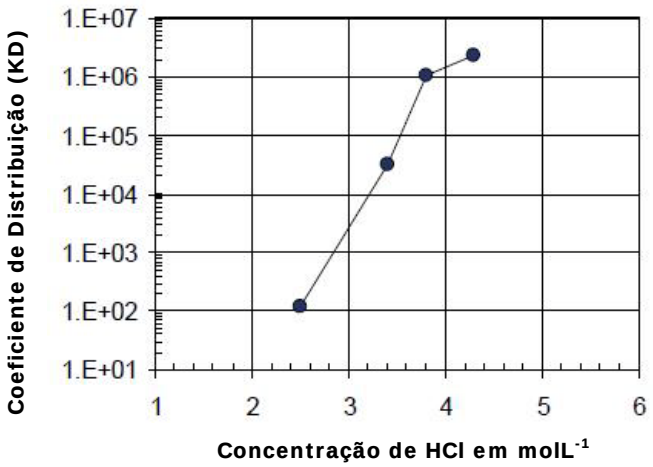

FIGURA 12 - Coeficiente de Distribuição de ^{68}Ga no cartucho de resina aniônica Chromafix SAX SPEC (Velikyan, 2005)

A recuperação do ^{68}Ga foi de (93±2)% em 200±20µL de água deionizada. A vantagem da recuperação do ^{68}Ga em água é que não é necessário aquecimento para remover o solvente, como por exemplo a recuperação do ^{68}Ga que ocorre em meio ácido/acetona em que é necessário o aquecimento para a evaporar a acetona. Algumas moléculas, como os anticorpos monoclonais podem se degradarem em temperaturas acima de 35-45^{o}C (Velikyan, 2005; Velikyan, Maecke e Langstrom, 2008).

A TAB. 5 mostra as biomoléculas marcadas por Veilikyan (2005) com ^{68}Ga, após a pré-concentração e a purificação do ^{68}Ga em resina aniônica. As moléculas marcadas foram o DOTATOC, NODAGATATO (1,4,7- Tricarboximetil-1,4,7-triazaciclononan-1-yl-acetil-D-Phe-Cis-Tyr-D-Trp-Lis-Thr-Cis-L-Thr(NODAGA-Tyr^{3}-Octreotato) e o DOTA-RGD (Cis2-6;c[CH_2CO-Lis(DOTA)—Cis-Arg-Gli-Asp-Cis-Phe-Cys]-CCX_6-NH_2) sob aquecimento em microondas (30-120 segundos). Em microondas, o tempo de reação é menor que em aquecimento de maneira convencional. Na TAB. 5, estão expressos o tempo de uso do gerador de ^{68}Ge/^{68}Ga, a massa da biomolécula, o rendimento de marcação, a atividade de ^{68}Ga e a atividade específica. Mesmo após um longo período de uso do gerador, o rendimento de marcação foi superior a 95%.

TABELA 5 - Condições de marcação e parâmetros de qualidade da marcação de peptídeos conjugados com ^{68}Ga purificado em resina aniônica (Veilikyan, 2005)

Tempo de uso do Gerador ^{68}Ge-^{68}Ga (meses)	**Peptídeo conjugado**	**Concentração de Peptídeo (nanomol)**	**Rendimento de Marcação (%)**	**Atividade de ^{68}Ga (MBq)**	**Atividade Específica (MBq/nmol)**
1	DOTATOC	1	>99	1289	997
1	DOTATOC	0,5	>99	1286	2003
1	DOTATOC	0,3	>98	1251	3307
14	DOTATOC	1	>99	357	308
14	DOTATOC	0,5	>99	337	537
14	DOTATOC	0,3	>99	329	843
29	DOTATOC	1	>99	78	61
1	NODAGATATO	1	>99	1275	1011
1	NODAGATATO	0,5	>99	1110	1758
14	NODAGATATO	1	>98	357	281
14	NODAGATATO	0,5	>96	323	493
29	NODAGATATO	2	>98	77	30
1	DOTA-RGD	1	>99	1253	976
1	DOTA-RGD	0,5	>99	1213	1869
1	DOTA-RGD	0,25	>96	1256	3756
14	DOTA-RGD	0,5	>99	362	570
14	DOTA-RGD	0,25	>96	369	953
29	DOTA-RGD	1	>98	72	56

Ugur *et al* (2002) estudaram a marcação do DOTATOC com o ^{66}Ga, produzido em cíclotron, através do bombardeamento de alvo de zinco natural e enriquecido eletrodepositado. A técnica de purificação utilizada foi de extração por solventes usando éter diisopropílico e HCl. Após a extração para a fase orgânica, o ^{66}Ga foi

retomado em água. Este processo também foi estudado por Brown (1971) e por Nachtrieb e Fryxell (1949) em ambos os casos para a purificação do ^{67}Ga.

Os autores também estudaram a marcação do DOTATOC (10µg, em solução tampão de acetato de sódio) com o $^{67/68}$Ga em banho de óleo a 100ºC durante 15 minutos. O ^{67}Ga foi obtido comercialmente e não houve nenhum processo de purificação. O ^{68}Ga foi obtido através do gerador de ^{68}Ge-^{68}Ga [coluna de Sn (IV)] em HCl 5 mol.L^{-1}, que também passou um processo de extração por solventes em éter diisopropílico e foi retomado em solução tampão de acetato de sódio (0,4 molL^{-1}, pH 5,2). O rendimento de marcação foi entre 85-95% para ^{66,67,68}Ga – DOTATOC e pureza radioquímica foi superior a 95% para todos os compostos (Ugur *et al*, 2002).

4.3- Imagem Molecular em Medicina Nuclear

Imagem Molecular é a visualização, caracterização e o cálculo de processos biológicos em níveis moleculares e celulares em humanos e outros organismos vivos. As imagens moleculares geralmente incluem imagens bi ou tridimensionais, assim como a quantificação ao longo dos estudos. As técnicas disponíveis envolvem os radiofármacos (Medicina Nuclear – SPECT e PET), a ressonância magnética, a imagem ótica, o ultra-som, entre outras técnicas (Pomper e Gelovani, 2008).

Os radiofármacos usados em medicina nuclear têm um papel importante no diagnóstico e terapia de doenças de diversas origens. O PET e SPECT representam modalidades de imagem que permitem a detecção não-invasiva em estágio preliminar de doenças que têm como característica a alteração do metabolismo e da função biológica de um tecido anormal em nível celular (Wängler *et al*, 2011).

Para atingir este objetivo, os radiofármacos devem apresentar alta afinidade específica pelos receptores, expressos nos tumores alvo e uma eficiente internalização celular, para que haja uma alta concentração do composto nas células tumorais. O

tempo de eliminação da biomolécula marcada deve ser mais lento (em relação ao tempo de clareamento sanguíneo e captação tumoral), para que haja tempo suficiente para a realização das imagens (Tanaka e Fukasa, 2008).

Para que o uso do ^{68}Ga em imagem molecular seja eficiente, os complexos a serem marcados devem ser desenvolvidos com uma radioquímica prática e com propriedades biológicas favoráveis. Devido ao $t_{1/2}$ física curta, a marcação precisa ser rápida e eficaz e sem a necessidade da purificação posterior. Além disso, é necessária uma alta atividade específica quando o agente for marcado diretamente com o eluato de ^{68}Ga. Este agente deve possuir uma excelente estabilidade *in vivo*, para que o radionuclídeo não siga para locais onde não devem atuar, o que pode ocasionar uma radiotoxicidade (Ferreira *et al*, 2010).

4.3.1 - Agentes Quelantes

Uma prática comumente realizada em marcação de biomoléculas com metais é o uso de agentes quelantes apropriados para a formação de um complexo estável (Cooper, Sabbah e Mather, 2006). A liberação do radioisótopo pode fazer com que ele se ligue a proteínas séricas, como a transferrina, ou acumular-se em órgãos radiossensíveis, como nos ossos e na medula óssea ou na mucosa gastrointestinal (Velikyan, 2005). A vantagem destes agentes quelantes é que eles podem ser marcados com diversos tipos de metais, tanto para terapia quanto para diagnóstico.

Outro fator a ser considerado é a modificação das moléculas para se adequarem aos estudos *in vivo*. Um exemplo são os peptídeos e os anticorpos, que apesar da natureza protéica comum, apresentam propriedades estruturais e de cinética de distribuição distintas, que interferem e direcionam para aplicações específicas em medicina nuclear. Anticorpos e peptídeos são normalmente modificados para que se possa introduzir um agente quelante em sua estrutura, para então ser ligado a um radioisótopo desejado (Weiner e Thankur, 2002).

Um agente quelante é uma molécula neutra ou um íon que possui um par de elétrons que podem ser doado para formar um par de íons com um metal. Um agente quelante é uma molécula que contém um ou mais ligantes ou um átomo, como por exemplo: N, O, S que pode doar um par de elétrons livre (Vallabhajosula, 2009).

A escolha do agente quelante bifuncional é determinada pelo estado de oxidação e a natureza do radioisótopo. O radioisótopo quelado deve se manter afastado do sítio de ligação do receptor, para minimizar qualquer tipo de interferência (Liu *et al*, 2004).

Na década de 70 os agentes quelantes bifuncionais foram introduzidos para complexarem com metais, como por exemplo ^{67}Ga e ^{111}In. Diversos agentes quelantes bifuncionais foram desenvolvidos ao longo destes anos para serem marcados com uma variedade de radionuclídeos, alguns deles estão descritos na TAB. 6.

TABELA 6 - Agentes Quelantes Bifuncionais (Vallabhajosula, 2009)

Ácidos poliaminocarboxílicos	ácido dietileno triamino pentacético	DTPA
	ácido etilenodiamino tetra acético	EDTA
Macroclíclicos	ácido 1,4,7,10–tetraazaciclododecano - 1,4,7,10–tetracético	DOTA
	ácido 1,4,7-triazaciclononanetriacético	NOTA
	Ácido 1,4,8,11-tetraazaciclotetradodecano – N,N", N"', N"" - tetracético	TETA
Outros	Bis(tiosemicarbazona)	BTS
	Mercapto acetil glicilglicilglicina	MAG_3

Agentes quelantes como o DTPA e o EDTA são de cadeia aberta (FIG. 13), enquanto o NOTA, DOTA e o TETA são cíclicos (ou macrocíclicos) como mostra a FIG. 14. Estes possuem o grupo macrocíclico triaza ou tetraaza variando de 9-14 membros o tamanho do anel. O ligante macrociclíco é geralmente mais estável termodinamicamente e cineticamente em relação aos agentes quelantes acíclicos. O bis(tiosemicarbazona) (BTS) foi desenvolvido especificamente para se ligar ao átomo de Cu e contém os átomos N e S. O Mercapto acetil glicilglicilglicina (MAG_3) também contém os átomos N e S, mas foi desenvolvido para se ligar aos radiofármacos com ^{99m}Tc (Vallabhajosula, 2009).

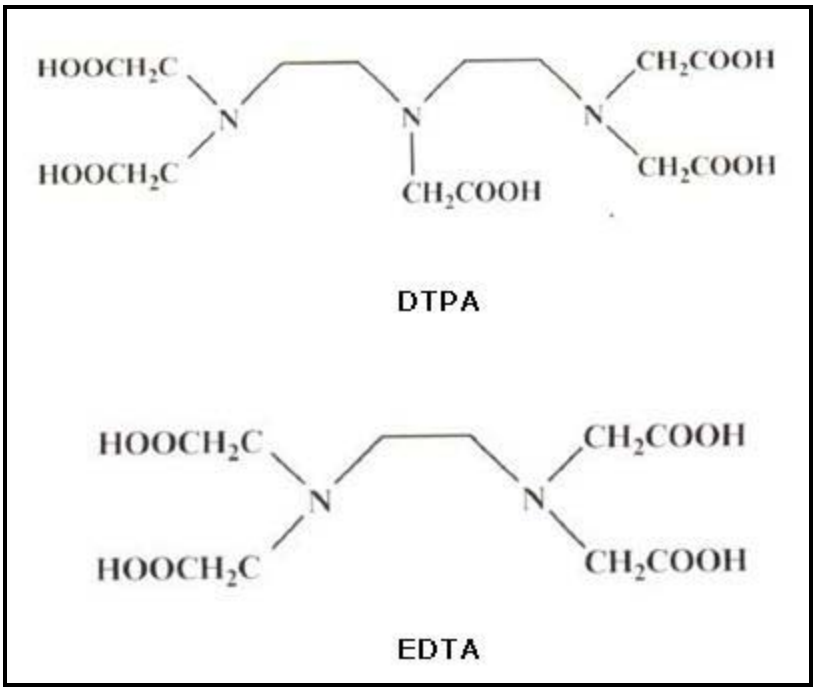

FIGURA 13 - Representação dos agentes quelantes de cadeia aberta (Vallabhajosula, 2009)

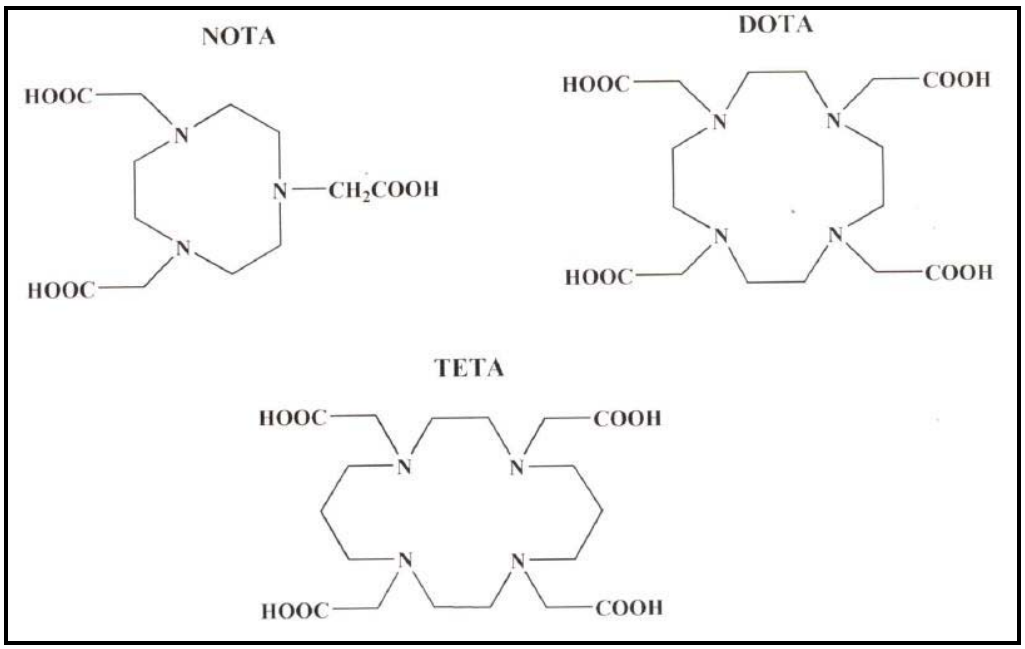

FIGURA 14 - Representação dos agentes quelantes macrocíclicos NOTA, DOTA, TETA (Vallabhajosula, 2009)

`

Muitos agentes quelantes bifuncionais, principalmente os macrocíclicos, estão disponíveis para a incorporação do gálio na sua forma estável (Ga^{3+}) (Vallabhajosula, 2009). Agentes quelantes macrocíclicos bifuncionais podem formar complexos estáveis através de ligações catiônicas e covalentes com macromoléculas (peptídeos e anticorpos). Agentes quelantes como o DOTA têm sido extensamente utilizados para a complexação com $^{66/67/68}Ga$, $^{64/67}Cu$, $^{86/90}Y$ e ^{177}Lu. A alta estabilidade do composto é devido ao fato das reações de dissociação serem extremamente lentas (Velikyan, 2005).

4.3.1.1 - Agentes Quelantes para Gálio

A única forma química estável do gálio em solução aquosa é o Ga^{3+} (catiônico), que pode hidrolisar ou precipitar em pH 3-7 para a forma insolúvel de trióxido, se a

concentração exceder os níveis nanomolar. Porém, na presença de agentes estabilizantes, este processo pode ser evitado. Em pH fisiológico (7,4), o gálio é solúvel, pois há a formação de íons $[Ga(OH)_4]^-$. A forma catiônica (Ga^{3+}) é classificada como metal ácido forte, que pode formar complexos estáveis com muitos ligantes contendo oxigênio e nitrogênio, assim como o enxofre, como doador de elétrons. Portanto, é adequado que o gálio seja conjugado com agentes quelantes complexados com biomoléculas ou outras macromoléculas (Velikyan, 2005).

O agente quelante DOTA usado com o Ga^{3+} é mais utilizado para ligar biomoléculas com radioisótopos para PET, que apresenta uma boa estabilidade química quando administrado *in vivo*. Além disso, este complexo (M-DOTA) apresenta características de depuração sanguínea favoráveis (Tanaka *et al*, 2008). Também, é conhecido por formar um complexo termodinamicamente e cineticamente estável com um grande número de metais de cargas +2 e +3 (Aime *et al*, 1998).

Entretanto, a cavidade central do íon é considerada grande para o tamanho do Ga^{3+}, resultando na participação de apenas dois dos três grupos carboxílicos na formação do complexo (N_2O_4) (Eisenwiener *et al*, 2002). Além disso, a cinética do complexo DOTA com o Ga^{3+} é lenta e para ter um bom rendimento é necessária uma alta temperatura. Isto se torna um fator limitante para moléculas que não suportam altas temperaturas como os anticorpos monoclonais.

O agente quelante HBED-CC (N,N'-bis[2-hidroxi-5-(carboxiethil)benzil]etilenodiamina-N,N'-ácido diacético) é facilmente complexado com anticorpos e fragmentos de anticorpos e pode ser facilmente marcado com isótopos de gálio sob condições brandas (Eder *et al*, 2008; Eder *et al*, 2010), mas é raramente usado, pois são necessárias diversas etapas de marcação (Wängler *et al*, 2011).

Outro agente quelante importante é o NOTA, sua cavidade possui o tamanho ideal para os íons do gálio, resultando em um complexo termodinamicamente mais estável em relação ao DOTA (logK NOTA-Ga=30,98 e logKDOTA-Ga = 21,33) (Clarke e

Martell, 1991; Clarke e Martell, 1991). Todos os grupos carboxílicos e os átomos de nitrogênio estão envolvidos na síntese do complexo. Além disso, a cinética entre o Ga^{3+} e o NOTA é muito mais rápida em relação ao Ga^{3+}-DOTA e não necessita de aquecimento. No entanto, quando o NOTA é introduzido em uma biomolécula por transferência de um grupo carboxílico por um grupo amida, a estabilidade do complexo é reduzida, pois a amida não é um doador forte como o oxigênio do grupo carboxílico (Boswell *et al*, 2008; Sherry *et al*, 1989). Para prevenir a redução da estabilidade do complexo, foram desenvolvidas moléculas derivadas do NOTA com a adição de grupos funcionais que se ligaram à biomolécula e mantiveram a característica de complexarem rapidamente sem a necessidade de aquecimento, como por exemplo o p-SCN-Bn-NOTA (S-2-(4-Isotiocianatobenzil)-1,4,7-triazaciclononane-1,4,7-ácido triacético) e o NODAGA (1,4,7-triazaciclononane,1-ácido glutárico-4,7-ácido acético) (Wängler *et al*, 2011).

Heppeler *et al* (1999) realizaram o estudo de marcação do DOTATOC (FIG. 15) com ^{67}Ga, ^{111}In e ^{90}Y e mostraram que há também a influência do radionuclídeo. A mesma metodologia foi utilizada para os três radioisótopos, ou seja, a complexação foi realizada sob aquecimento (90ºC, 25-30 minutos) do DOTATOC com o ^{67}Ga, ^{111}In e ^{90}Y. O rendimento das marcações foi superior a 99,5% e a atividade específica > 40GBqμmol^{-1}. No estudo de biodistribuição, foi avaliada a captação renal e tumoral em camundongos nude com tumor pancreático AR4-2J (provenientes de ratos) em comparação com ^{111}In-DTPA^{0}-$_{D}$-Phe^{1}-octreotídeo (Octreoscan®) (FIG. 16) usado como método padrão, Os resultados estão sintetizados na FIG. 17.

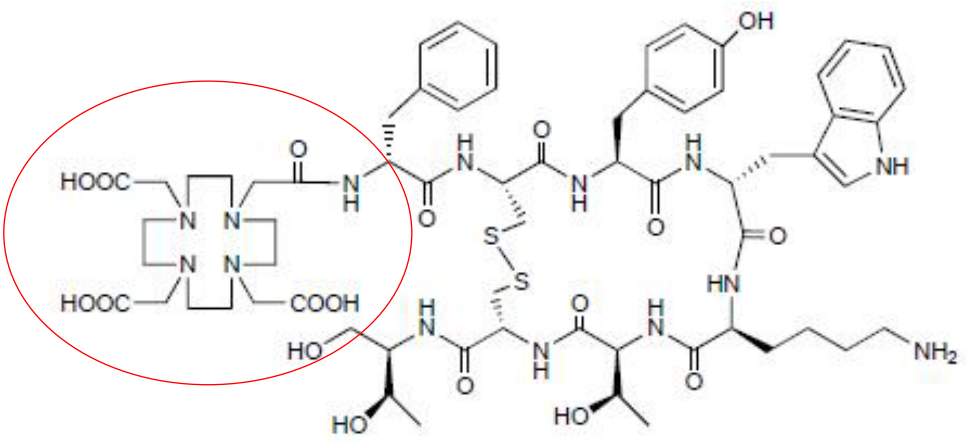

FIGURA 15– Fórmula Estrutural do DOTATOC. Em destaque o agente quelante DOTA (Heppeler *et al*,1999)

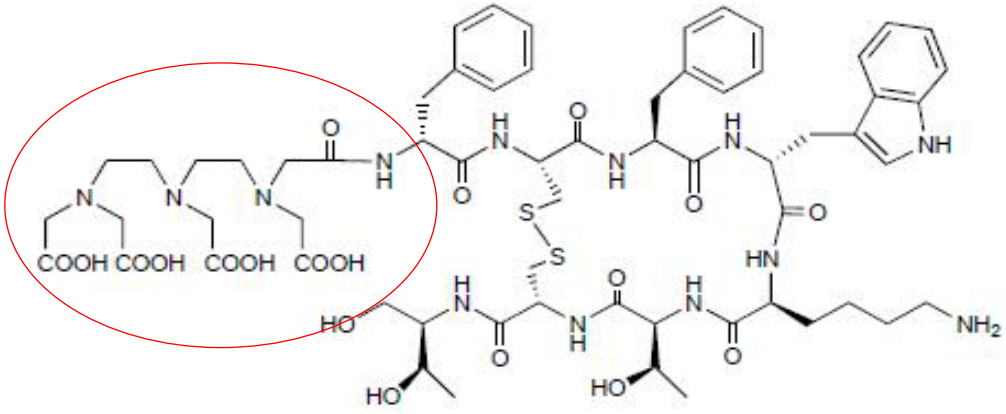

FIGURA 16- Fórmula Estrutural do DTPA- octreotideo. Em destaque o agente quelante DTPA (Heppeler *et al*,1999)

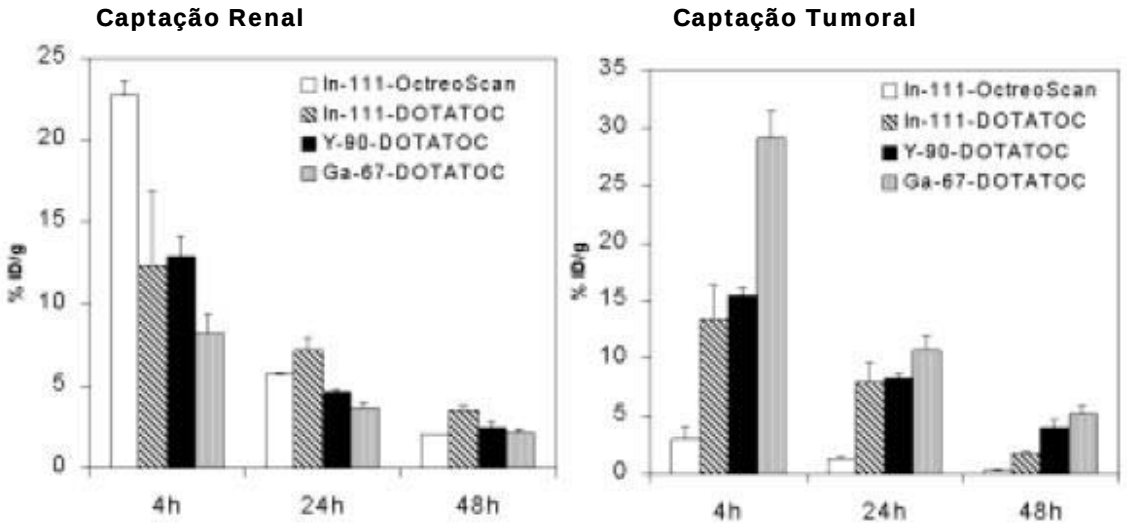

FIGURA 17 – Estudo de biodistribuição do DOTATOC marcado com ^{67}Ga, ^{111}In e ^{90}Y em comparação com ^{111}In-DTPA-octreotideo, administrado em camundongos nude com tumor pancreático AR4-2J

Os compostos marcados mostraram que possuem uma maior captação tumoral e menor captação hepática em relação ao ^{111}In-DTPA-octreotídeo. A captação tumoral do ^{67}Ga-DOTATOC foi significantemente maior que a dos outros compostos, no estudo realizado após quatro horas da administração dos radiofármacos, e apresentou menor captação renal. Apesar da captação tumoral ser muito importante, a baixa captação renal também dever ser considerada, pois os rins aparecem como o órgão mais afetado pelos danos da radiação. Após a filtração glomerular, os peptídeos são reabsorvidos pelos túbulos renais e retidos parcialmente, o que pode causar danos a longo prazo, principalmente se for utilizado em radioterapia com radionuclídeos (^{90}Y-DOTATOC). A desvantagem do ^{67}Ga-DOTATOC é em relação à sua estabilidade *in vivo*, que é menor em relação aos outros compostos. Após 4-6 horas, foram encontrados dois metabólitos, o principal sendo o ^{67}Ga-DOTA-$_D$-Phe e uma pequena quantidade de ^{67}Ga-DOTA. Este estudo mostra que pequenas alterações no composto marcado podem alterar a ligação com os receptores de somatostatina (Heppeler *et al*,1999).

4.3.2 – Radiofármacos Destinados a Alvos Específicos

Nos últimos anos, a medicina tem se voltado aos estudos de prevenção, diagnóstico e terapia personalizada focada em nível molecular e genético, alterando o manejo de cada doença de acordo com o quadro do paciente/doença (Baum e Roesch, 2011). Isto inclui o estudo de alvos específicos, ou seja, radiofármacos baseados na ligação com o receptor no tecido danificado. O acúmulo do radiofármaco quando se liga ao receptor com alta afinidade e especificidade do tecido lesionado leva à localização da doença (Liu, 2004). O maior desafio nesta área é a redução de custo, porém existem muitas barreiras financeiras, práticas e das próprias agências regulatórias que precisam ser superadas para atingir este objetivo (Nunn, 2007).

Diversas moléculas marcadas com radionuclídeos têm sido estudadas com este objetivo, principalmente os anticorpos monoclonais, os fragmentos de anticorpos e os peptídeos. Como conseqüência destes intensos estudos nesta área muitas moléculas marcadas já são utilizadas na rotina clínica como o ^{111}In-DTPA-octreotídeo (Octreoscan®) e o ^{177}Lu- DOTATATO, comercializado pela DIRF (IPEN/CNEN-SP).

4.3.2.1 – Anticorpos Monoclonais

Os anticorpos monoclonais (mAbs) são considerados agentes promissores por possuírem uma alta especificidade pelo alvo, assim como os peptídeos. Anticorpos de diferentes epitopos são produzidos quando um animal é exposto a um único antígeno. Estes anticorpos são chamados de anticorpos polimonoclonais, pois cada anticorpo é derivado a um clone diferente de células plasmáticas. Estes anticorpos podem ser usados para detectarem antígenos em humanos, porém apresentam baixa especificidade. Em 1975, George Kohler desenvolveu a tecnologia dos anticorpos monoclonais, também chamada de hibridoma, que consiste na exposição do anticorpo

a apenas um epitopo e permite a produção de apenas anticorpos específicos. Estes anticorpos possuem uma forte ligação cinética com antígenos (avidez) e estritamente ligado aos antígenos determinantes (especificidade) (Weinberg, 2008).

O sistema imune é altamente especializado na detecção e eliminação de agentes infecciosos, incluindo vírus, bactérias e fungos. Uma das maiores questões estudadas na última metade do século passado é de como o sistema imune também poderia ser capaz de fazer o reconhecimento e de eliminar células tumorais. As moléculas de anticorpo formadas por células B e seus descendentes após a apresentação de antígenos podem reconhecer e ligar as partículas infecciosas, neutralizando-as. Nesta mesma linha, é possível que as células tumorais que apresentem proteínas antigênicas de superfície possam desencadear a produção de anticorpos pelo sistema imune (Weinberg, 2008).

Em 1992, foi aprovado o primeiro anticorpo monoclonal murínico marcado com ^{111}In pelo FDA (*Food and Drug Administration*) para diagnóstico de recorrência de câncer colo retal e ovário (OncoScint®, 1992). Posteriormente, outros anticorpos monoclonais marcados com radionuclídeos foram aprovados para diagnóstico e terapia para outras doenças, como mostra a TAB. 7 (Olafsen e Wu, 2010):

TABELA 7 – Anticorpos Monoclonais usados em aplicações clínicas e aprovados pelo *FDA* (Olafsen e Wu, 2010)

Nome Genérico	**Nome Comercial**	**Data de Aprovação pelo FDA**	**Alvo**	**Radioisótopo**	**Indicações aprovadas**
Satumomab pendetideo*	OncoScint®	12/1992	TAG-72	^{111}In	Carcinoma de ovário e colo retal
Arcitumomab	CEA-Scan®	06/1996	CEA	^{99m}Tc	Carcinoma de mama, colo retal e pulmão
Imciromab pentetato*	Centocor®	07/1996	Miosina	^{111}In	Necrose do miocárdio
Nofetumomab merpentan	Verluma®	08/1996	Glicoproteína (40kDa)	^{99m}Tc	Carcinoma de células pequenas e não pequenas de pulmão
Cepromab pendetideo	ProstaScint®	10/1996	Glicoproteína (100 kDa)	^{111}In	Carcinoma de próstata
Ibritumomab tiuxetan	Zevalin®	02/2002	CD20	^{90}Y	Linfoma não-Hodgkin
Tositumomab	Bexxar®	06/2006	CD20	^{131}I	Linfoma não-Hodgkin

* não comercializados

A desvantagem desta técnica é que os anticorpos quando administrados *in vivo* possuem uma lenta depuração sanguínea (Liu, 2004), o que faz com que o composto tenha que ser injetado dias antes para realizar a imagem. Um exemplo é o ^{111}In-Cepromab Pendetideo (ProstaScint®), para diagnóstico de câncer de próstata recorrente, onde a imagem é realizada 5 dias após a administração do radiofármaco (Weiner e Thankur, 2002). Em um estudo realizado por Scheidhauer *et al* (2002)

avaliou-se a biodistribuição e a cinética do ^{131}I-IDEC-C2B8 (Rituximab®, Roche Pharma, Suíça) em pacientes com linfoma Não-Hodgkin. Após 1 hora da injeção do radiofármaco, as primeiras imagens foram realizadas, mostrando que a atividade se encontrava na corrente sanguínea, no coração, grandes vasos, fígado, baço e rins. Ao longo do tempo, esta atividade foi diminuindo e finalmente alcançando o tumor. Na maioria dos pacientes, o tumor ficou evidenciado após 144 horas. A FIG. 18 mostra uma representação de uma cintilografia comparando as imagens realizadas com 1 hora e 120 horas após a injeção.

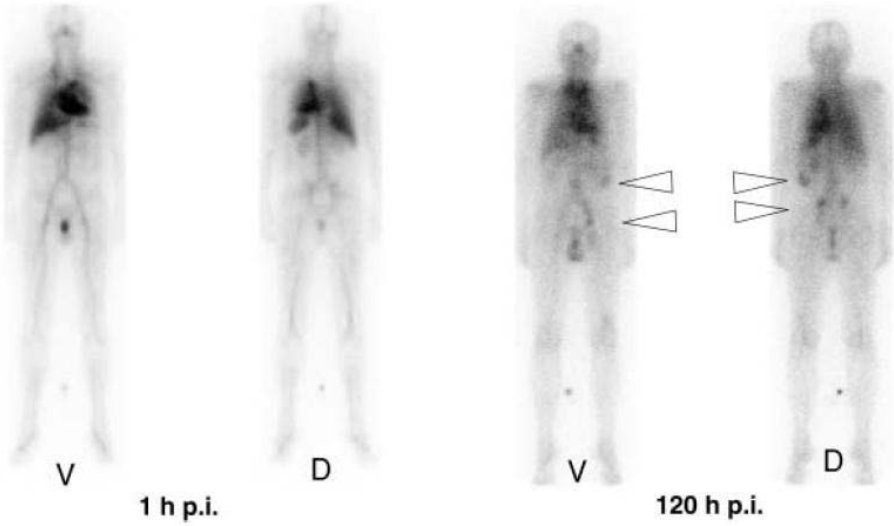

FIGURA 18- Cintilografia de corpo inteiro adquirida com 1 hora e 120 horas após a injeção do ^{131}I-IDEC-C2B8 (Scheidhauer *et al*, 2002)

Estudos de imagens com anticorpos mostraram que a depuração sanguínea é inversamente proporcional ao tamanho da proteína. Por isso, anticorpos intactos permanecem mais tempo no organismo (Olafsen e Wu, 2010).

A marcação de anticorpos monoclonais intactos com ^{68}Ga não é algo promissor, devido à discrepância entre o tempo de meia vida física do ^{68}Ga e a farmacocinética

lenta da maioria dos anticorpos monoclonais. Entretanto, é possível marcar com radioisótopos de meia vida física mais longa (Breeman *et al*, 2011).

Uma propriedade desejável para a marcação de anticorpos com radioisótopos de meia vida física mais curta é reduzir o tamanho dos anticorpos, sem comprometer a sua especificidade, para se ter uma rápida depuração sanguínea (Olafsen *et al*, 2009). A produção de fragmentos de anticorpos geneticamente modificados de diferentes tamanhos e valências começou com a introdução de um fragmento de cadeia única variável (scFv, 25kDa) (FIG. 19). Usando o scFv como blocos de construção, uma grande quantidade de fragmentos de anticorpos foram gerados, como: diabodies (dímeros de scFv, 50kDa), minibodies (dímeros de scFv-C_H3, 80kDa) e dímeros scFv-Fc (fragmento cristalizado) (105kDa). Estes fragmentos apresentam uma melhor captação tumoral, depuração cinética mais rápida e excelente razão tumor/sangue. A desvantagem dos fragmentos é que eles possuem apenas um sítio de ligação do antígeno (monovalente), que implica na redução da afinidade tumoral do anticorpo.

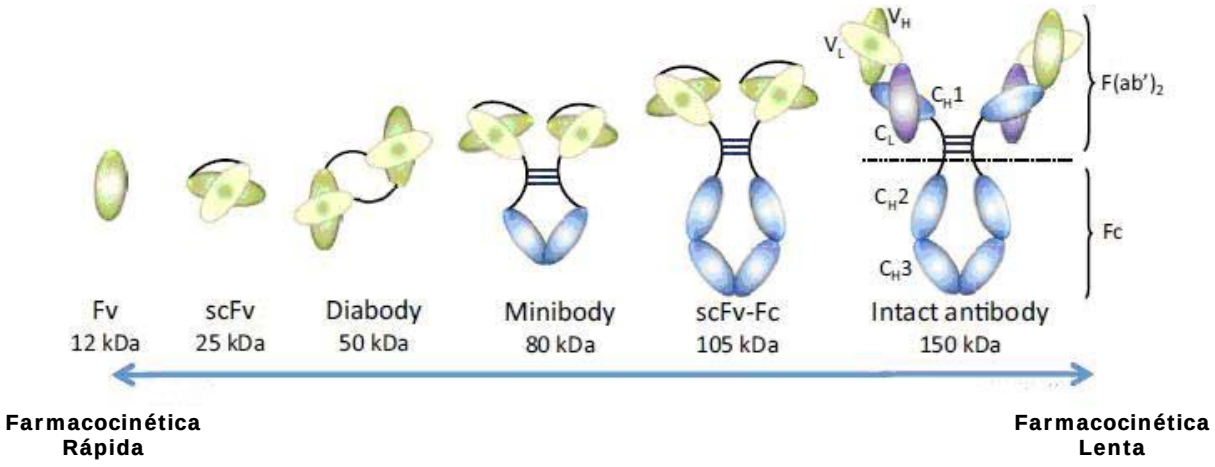

FIGURA 19- Representação do anticorpo intacto e de seus fragmentos modificados, incluindo fragmento único de domínio variável (Fv), cadeia única Fv (scFv), *diabody*, *minibody* e *scFv-Fc* (Olafsen *et al*, 2009)

Leung (2010) mostrou em estudos com animais, que os fragmentos de anticorpos marcado com o ^{68}Ga, possuem uma farmacocinética mais rápida e favorável para o ^{68}Ga, atingindo o alvo em aproximadamente 2 horas após a administração.

4.3.2.2 – Peptídeos

Nas décadas de 60 e 70, ocorreram as primeiras sínteses de peptídeos radiomarcados. Entretanto, o interesse para o emprego em diagnóstico e terapia ocorreu somente na década de 90, impulsionado pelo desenvolvimento de módulos de síntese automatizados e os bons resultados apresentados na literatura (Aldegheri, 2005; Tanaka, 2008).

O termo peptídeo é convencionalmente usado para se referir a moléculas com menos de 50 aminoácidos (cerca de 5,5 kDa). Eles possuem alta afinidade por células tumorais desde que expresse em suas membranas plasmáticas uma grande quantidade de receptores. A maioria dos tumores expressa receptores mediadores regulatórios do crescimento *in vivo,* que possuem afinidade por diferentes tipos de peptídeos, e muitos destes receptores são, além disso, expressos em maior quantidade em muitos cânceres primários em relação ao tecido normal, facilitando a visualização em medicina nuclear diagnóstica (Reubi, 2008; Weiner e Thankur, 2002).

Os peptídeos são moléculas pequenas e hidrofílicas, esta característica permite uma permeabilidade rápida ao receptores. Além disso, geralmente os peptídeos não atravessam a BHE, fazendo com que seja uma molécula para estudos de tumores periféricos. O cérebro expressa uma grande quantidade da maioria dos receptores, podendo originar alguns efeitos colaterais. Porém, quando a BHE já se encontra rompida, como no caso dos tumores gliais indiferenciados (glioblastomas), os peptídeos podem atingir estas células (Grozinsky-Glasberg, Grossman e Korbonits, 2008; Melero, 2008; Reubi, 2008,).

Certos tipos de tumores também podem ter uma resposta inibitória ou um crescimento promovido através de sinais de peptídeos, tornando-os importantes ferramentas no diagnóstico e tratamento de tumores. Um exemplo disso é o uso dos análogos da somatostatina, cujos receptores são expressos em grande quantidade em muitos tecidos neoplásicos. Esta se tornou uma ferramenta importante para o estudo destes tipos de tumores, em medicina nuclear, ou seja, análogos da somatostatina foram marcados com radioisótopos, emissores γ, para estudos funcionais (Dekker, 2004). A marcação de peptídeos com metais depende de alguns fatores, como:

- A ligação entre o peptídeo e o agente quelante deve ter um alto rendimento de marcação (>99,5%);
- Alta atividade específica e estável sob condições fisiológicas;
- A introdução do agente quelante na molécula não comprometa a afinidade com o sítio de ligação do receptor;
- A relação de captação tumor e não tumor;
- A molécula marcada deve ser hidrofílica e excretada pelo sistema urinário. (Hepeller *et al*, 1999; Velikyan, 2005)

4.3.2.2.1- Somatostatina

A somatostatina é um peptídeo cíclico com 14 aminoácidos que age como um neurotransmissor ou um hormônio dependendo do sitio de ação- e do tipo de célula alvo. Está presente no trato gastrointestinal, no sistema pancreático e no hipotálamo do córtex cerebral. A somatostatina inibe o crescimento e a proliferação de várias células tumorais, que expressam uma grande quantidade de seus receptores. Por este motivo, ela é utilizada no tratamento e no diagnóstico de tumores neuroendócrinos. Estes tumores frequentemente se originam no pâncreas e no trato gastrointestinal,

podendo incidir em outras estruturas intra ou extra-abdominais (Aldegheri, 2005; Sapienza, Buchpiguel, Hironaka, 2008).

Os receptores da somatostatina são expressos em 5 subtipos (sst1, sst2, sst3, sst4, sst5). Os receptores sst2, sst3 e sst5 são os mais comuns. Porém, existe uma grande variação destes subtipos expressos nos tumores (Oberg *et al*, 2004). Análogos da somatostatina sintéticos (octreotídeo, lanreotideo, [Tyr^3]octreotideo, [Tyr^3]octreotato) mostram uma alta afinidade pelos receptores da somatostatina, principalmente o sst2, rápida internalização, clareamento sanguíneo e excreção renal (Wild et al, 2005; Pettinato *et al*, 2008; Waser *et al*, 2009). Estes peptídeos foram modificados para que seus análogos sintéticos permanecessem mais tempo no organismo e não sofressem ação das peptidases (Grozinsky-Glasberg, Grossman e Korbonits, 2008; Reubi, 2008). O $t_{1/2}$ vida biológica circulante do análogo da somatostatina octreotídeo é 1,5 – 2 horas, característica que permitiu o uso clínico do peptídeo (Olsen *et al*, 1995). Além disso, em células tumorais a expressão de receptores é 100 vezes maior em relação às células normais (Neves e Lambrecht, 2002).

Atualmente, a cintilografia de receptores da somatostatina é realizada com o ^{111}In- Octreotídeo, para a avaliação da localização e estágio de tumores neuroendócrinos gastroenteropancreático, fornecendo informações sobre um futuro planejamento radioterápico. Entretanto, este método é baseado em imagens planares (SPECT), não permitindo a quantificação mais precisa dos receptores, o que pode ser mais precisamente quantificado em imagens PET. Além disso, o Octreoscan® (^{111}In-Octreotídeo) possui um alto custo, pois o ^{111}In é produzido em cíclotron, tem a sua disponibilidade restrita, baixa resolução de imagem e uma dosimetria relativamente alta para o paciente (Gabriel *et al*, 2003). Diversas publicações relataram a superioridade do PET em comparação com o SPECT, em relação à taxa de detecção, sensitividade, resolução e quantificação, principalmente em pequenas lesões, devido às

limitações da cintilografia com Octreoscan®, devido à intensa captação hepática, no baço e nos rins (de Herder *et al*, 2005; Hofmann *et al*, 2001; Modlin *et al*, 2005).

Os análogos da somatostatina marcados com ^{68}Ga, que possui um $t_{1/2}$ curta, permitem a captação de imagens dos receptores, enquanto mantêm doses de radiação aceitáveis para o paciente, além de permitir a repetição do exame no mesmo dia. O PET oferece uma resolução espacial melhor em comparação com a cintilografia (3-6mm versus 10-15mm) e a quantificação do traçador é facilitada.

Os análogos da somatostatina, quando sintetizados com o agente quelante DOTA, mostraram uma alta estabilidade *in vivo* e *in vitro*. Além disso, a presença do Ga^{3+} na cavidade do DOTA aumenta a afinidade pelos receptores, quando comparado com outros metais trivalentes, como o Y^{3+} e o In^{3+} (Breeman *et al*, 2005), provavelmente devido às diferenças entre a química de coordenação (Roesch e Riss, 2010).

A cinética do ^{68}Ga-DOTA-peptídeos, como o DOTATOC, DOTANOC [(DOTA^0, 1-Nal^3) Octreotídeo] e DOTATATE (FIG. 20) é rápida (Hofmann *et al*, 2001) e está de acordo com a meia vida física do ^{68}Ga. O tamanho pequeno destas moléculas mostra propriedades farmacocinéticas favoráveis, o processo de ligação com a proteína G (receptores onde são expressos os receptores da somatostatina) é rápido, assim como a depuração sanguínea, ambas as características são essenciais para o sucesso da aplicação clínica da molécula (Fischman, Babich e Strauss, 1993).

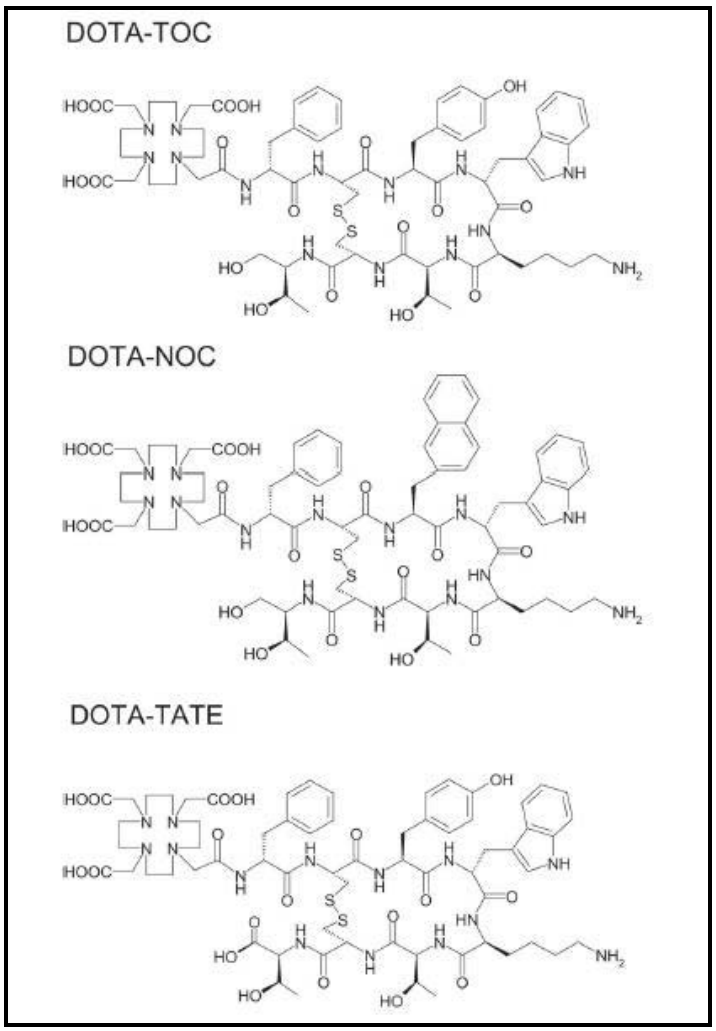

FIGURA 20 - Fórmula Estrutural do DOTATOC, DOTANOC e DOTATATE (Breeman *et al*, 2010)

O DOTANOC possui uma alta afinidade pelos receptores sst2, sst3 e sst5. Em estudo realizado por Antunes *et al* (2007) comparou-se a eficácia do ^{68}Ga-DOTANOC e o ^{68}Ga-DOTATATE, mostrando que o ^{68}Ga-DOTANOC é superior em relação ao ^{68}Ga-DOTATATE. Portanto, Prasad e Baum (2007) utilizam o ^{68}Ga-DOTANOC na rotina clínica.

Em outro estudo realizado por Ruffini *et al* (2006), foi demonstrada a importância do ^{68}Ga-DOTANOC em pacientes com neuroblastoma, que surge através do sistema nervoso simpático. É um tumor sólido na infância, de alta malignidade e é

mais comum aparecer em regiões extracranianas. Os receptores da somatostatina estão associados com fatores biológicos e clínicos do neuroblastoma. Uma comparação entre o ^{68}Ga-DOTANOC e o ^{18}F- FDG (FIG. 21) em paciente com neuroblastoma, demonstrou uma intensa captação do metabolismo da glicose e intensa expressão dos receptores da somatostina nos mesmo locais, porém na região cerebral em que há intensa captação de glicose não é possível identificar as lesões, ao contrário das imagens realizadas com ^{68}Ga-DOTANOC.

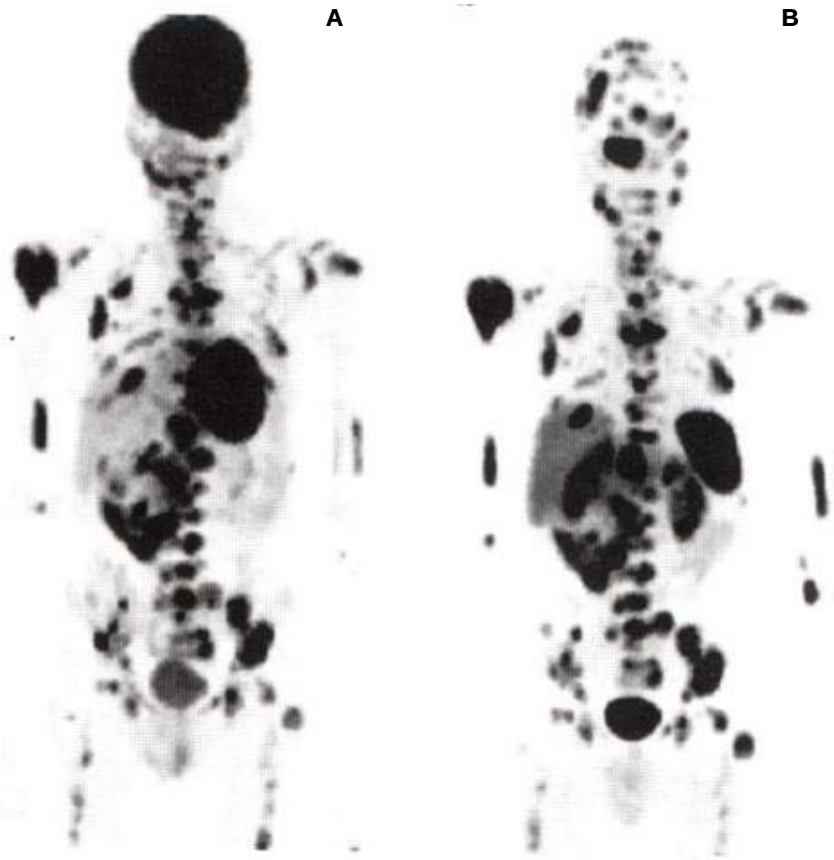

FIGURA 21 - Comparação entre o ^{18}F- FDG (A) e o ^{68}Ga-DOTANOC (B) em paciente com neuroblastoma (Ruffini *et al*, 2006)

No entanto, a literatura mostra a importância de estudos realizados com o ^{68}Ga-DOTATOC, que mostrou ser mais efetivo na detecção de tumores neuroendócrinos em relação ao ^{18}F-FDG, foram detectadas 57/63 lesões em 15 pacientes em comparação com apenas 43/63 lesões com ^{18}F-FDG (Koukouraki *et al*, 2006).

A FIG. 22 mostra uma comparação entre o ^{68}Ga-DOTATOC, ^{111}In-Octreotídeo e o ^{18}F- Fluoreto em um paciente com múltiplos nódulos no fígado e metástases nos linfonodos (Gabriel *et al*, 2007).

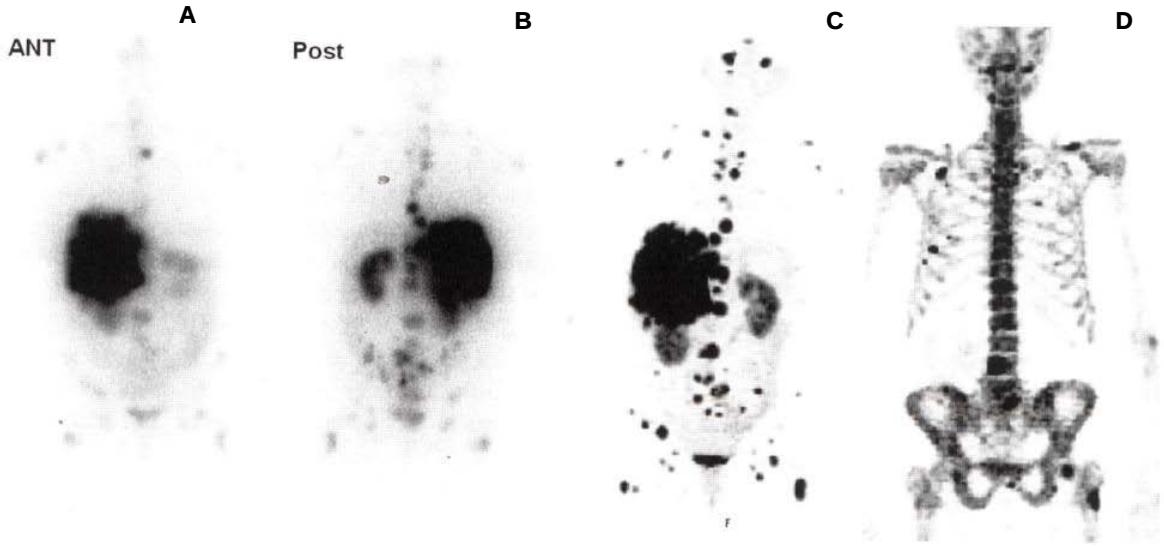

FIGURA 22 - Comparação entre ^{111}In-Octreotídeo (A- imagem anterior, B- imagem posterior), ^{68}Ga-DOTATOC (C) e o ^{18}F- Fluoreto (D), respectivamente. A imagem realizada em PET com a administração de ^{68}Ga-DOTATOC mostra claramente as metástases ósseas confirmadas com o ^{18}F- Fluoreto, enquanto que o ^{111}In-Octreotídeo mostra apenas algumas lesões ósseas (Gabriel *et al*, 2007).

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1- Infraestrutura e Equipamentos

Todos os procedimentos foram realizados nos laboratórios da DIRF (IPEN-CNEN/SP). Os principais equipamentos utilizados foram:

- Purificador de Água – Elix 10, Millipore Co., EUA. Parâmetros da água: Resistividade elétrica (> 5 MΩ.cm a 25°C); TOC (< 30 µg.L^{-1}) e condutividade elétrica (< 0,2 µs/cm a 25°C).
- Balança analítica, modelo AUW 220, Shimadzu, Japão,
- Balança semi-analítica, modelo EB – 2200HU, Shimadzu, Japão,
- Calibrador de dose, CRC – 15BC, Capintec Inc., EUA,
- Capela com sistema de exaustão, Braslab Equipamentos para Laboratório Ltda, Brasil,
- Chapa de aquecimento com agitador – RH basic 2 IKAMAG® - IKA®, Alemanha,
- Espectrômetro de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES), Varian Vista – MPX, Varian Inc., EUA,
- Espectrômetro de radiação gama constituído de um detector de germânio hiperpuro (HPGe), modelo GX1518, acoplado a um sistema de aquisição multicanal da Canberra Inc., EUA,
- Estufa para Esterilização e Secagem por Convecção Natural – ORION® Linha 515 – Fanem Ltda, Brasil,

5.2- Reagentes e Materiais em Geral

- Acetato de amônio, Merck KGaA, Alemanha,
- Acetona , Merck KGaA, Alemanha,
- Citrato de sódio, Merck KGaA, Alemanha,
- Éter Diisopropílico, Merck KGaA, Alemanha,
- DOTATOC, Pichem, Áustria
- Filtros 0,22 µm - Millex® Filter units , Millipore Co., EUA,
- Fitas para cromatografia em camada delgada de sílica gel ITLC-SG (*Instant Thin Layer Chromatography* – Sílica – Gel), Pall Life Sciences, EUA,
- Geradores de ^{68}Ge-^{68}Ga (1.110 MBq/30 mCi), *Cyclotron Co. Ltd.* (Obninsk, Rússia) adquiridos em 2008 e 2011,
- Gálio-67, MDS Nordion, Canadá,
- HCl 37% , Merck KGaA, Alemanha,
- HCl 30% (Suprapuro) , Merck KGaA, Alemanha,
- HNO_3 65 %, Merck KGaA, Alemanha,
- Metanol, Merck KGaA, Alemanha,
- Micropipeta plástica (Sigma-Aldrich®, EUA),
- NaI , Fluka Analytical, Suíça,
- NaOH , Merck KGaA, Alemanha,
- NH_4OH, Merck KGaA, Alemanha,
- Padrao Multielementar para ICP-OES em HNO_3 2-3% (1000 mg.mL-1) - Merck KGaA, Alemanha,
- Padrao de Ge para ICP-OES em HNO_3 2-3% (1000 mg.mL-1) – Merck KGaA, Alemanha,

- Papel indicador de pH , Merck KGaA, Alemanha,
- Pipetas automáticas - Pipetman®, Gilson Inc., EUA,
- Resina de Adsorção XAD-16, Amberlite, EUA;
- Resina de troca aniônica – AG1-X8, Bio-Rad Laboratories, EUA,
- Resina de troca aniônica – Chelex 100 (100-200 mesh), Bio-Rad Laboratories, EUA,
- Resina de troca catiônica – AG50WX2 (100-200 mesh), Bio-Rad Laboratories, EUA,
- Resina de troca catiônica – AG50WX4 (100-200 mesh), Bio-Rad Laboratories, EUA,
- Resina de troca catiônica – AG50WX4 (200-400 mesh), Bio-Rad Laboratories, EUA,
- Resina de troca catiônica – AG50WX8 (200-400 mesh), Bio-Rad Laboratories, EUA,
- Resina de troca catiônica – AG50WX8 (>400 mesh) – Doação
- Resina de troca catiônica – Dowex 50W-X8 (200-400 mesh), Bio-Rad Laboratories, EUA,
- Resina de troca catiônica – AG50WX12 (100-200 mesh), Bio-Rad Laboratories, EUA,
- Seringa 1mL Padrão (BD®, Brasil),
- Sep-Pak C-18 de fase reversa (Waters Corporation, EUA),
- Sulfato de Zinco Heptahidratado, Merck KGaA, Alemanha,
- Vidrarias em geral

5.3- Métodos

5.3.1- Gerador de $^{68}Ge/^{68}Ga$ e ^{67}Ga

Foram usados dois geradores de $^{68}Ge/^{68}Ga$ (FIG. 23) provenientes da empresa *Cyclotron Co. Ltd.* (1.110 MBq/30 mCi, Obninsk, Rússia). O primeiro gerador de $^{68}Ge/^{68}Ga$ foi adquirido em 2008 e o segundo em 2011.

FIGURA 23- Gerador de ^{68}Ge-^{68}Ga comercializado pela empresa *Cyclotron Co. Ltd*

O primeiro gerador não trazia uma especificação exata do fabricante em relação ao volume de HCl 0,1 $molL^{-1}$ para a eluição. Na literatura, foram encontrados valores variáveis em relação ao volume da solução ácida usada como eluente (4-10 mL), com tempo da eluição similar (2-3 minutos) (Asti *et al*, 2008; Ocak *et al*, 2010; Zhernosekov *et al*, 2007). Por este motivo, foi realizada uma curva de eluição com um volume total de 20mL de HCl 0,1 $molL^{-1}$, fracionado de 1 em 1mL e a atividade de ^{68}Ga

foi medida no calibrador de doses (Capintec®). No segundo gerador, a eluição foi realizada seguindo as especificações do fabricante, ou seja, 5mL de HCl 0,1 $molL^{-1}$.

A eficiência de eluição dos dois geradores foi avaliada ao longo do período em que foram utilizados, sendo o primeiro gerador utilizado por mais de dois anos e o segundo durante um ano. A eficiência do gerador é calculada através da relação do rendimento teórico com a atividade obtida do gerador de ^{68}Ge-^{68}Ga (eq. 1).

O ^{67}Ga é proveniente da empresa MDS Nordion®. Em alguns experimentos foi usado como um substituto do ^{68}Ga.

(eq. 1)

$$A_2 = \frac{\lambda_2}{\lambda_2 - \lambda_1} A_1^0 \left(e^{-\lambda_1 t} - e^{-\lambda_2 t}\right)$$

Onde: λ_1:constante de decaimento do ^{68}Ge

λ_2:constante de decaimento do ^{68}Ga

t= tempo de crescimento

$\lambda = 0{,}693/t_{1/2}$

A_2 = Atividade do elemento pai

A_1^0 = Atividade do elemento filho

5.3.2 – Controle de Qualidade do Gerador de ^{68}Ge - ^{68}Ga

5.3.3 – Controle Radionuclídico

A única impureza radionuclídica do ^{68}Ga é o ^{68}Ge. O nível de impureza do ^{68}Ge, foi medido após o decaimento completo do ^{68}Ga (>24horas) em um detector de germânio hiperpuro da Canberra acoplado a um sistema de multicanal gerenciado pelo programa Geniepc (FIG. 24). Este tipo de controle mede a quantidade de ^{68}Ge presente na amostra de ^{68}Ga. No mesmo dia da eluição, mede-se a atividade de ^{68}Ga obtida na amostra. Como a $t_{1/2}$ do ^{68}Ga é 68 minutos, após 24 horas, todo o ^{68}Ga

contido na amostra decaiu para ^{68}Zn (estável) e se a amostra for medida novamente, todo ^{68}Ga virá do decaimento do ^{68}Ge presente como impureza. A atividade de ^{68}Ge é então calculada pela equação do crescimento de ^{68}Ga (eq.1). Segundo o fabricante do gerador de $^{68}Ge/^{68}Ga$ o limite para o nível de ^{68}Ge no eluído é 0,01%.

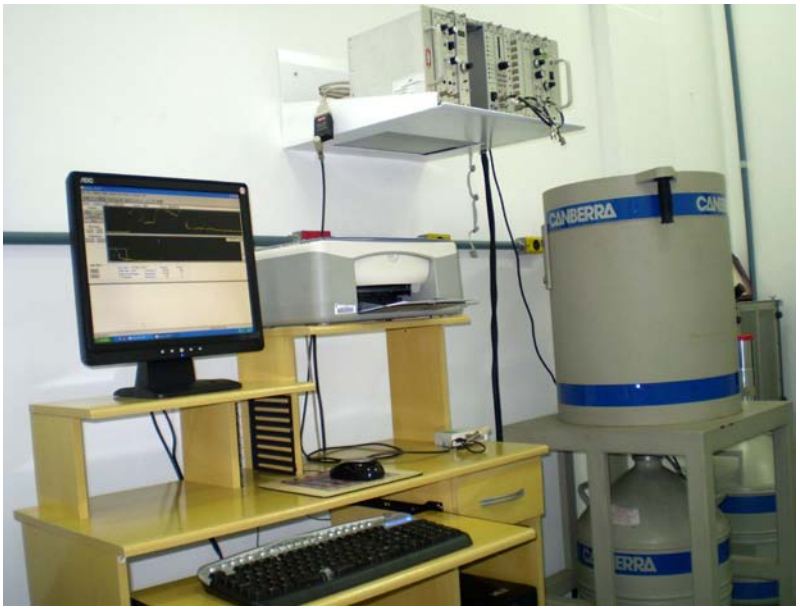

FIGURA 24 - Detector de germânio hiperpuro da Canberra acoplado a um sistema de multicanal (DIRF-IPEN/CNEN-SP)

O detector de germânio hiperpuro é um detector semicondutor com boa resolução para medidas qualitativas e quantitativas de raios X e raios gamas. A quantificação da atividade de cada radioisótopo é feita através das áreas dos fotopicos que aparecem nos espectros de pulsos, podendo apresentar fotopicos de 100 a 2000 keV (Keller, 1981; Nascimento, 1993).

> "Esta quantificação dos fotopicos, pode ser feita de modo rápido, automático e com menor grau de erro operacional, fazendo-se o acoplamento de um microcomputador ao analisador multicanal. Desse modo, pode-se fazer a

transferência dos dados dos espectros de pulsos e através de um programa especifico pode-se localizar automaticamente os fotopicos e quantificar suas áreas, além de se determinar a energia dos raio gama detectados a partir de uma curva de calibrarão colocada na memória do computador (Nascimento, 1993).”

Para as análises quantitativas, a atividade foi calculada através das equações 1 e 2:

(eq.2)

$$dps = \frac{cps}{a_y \,.\varepsilon_y}$$

Onde:

dps= desintegração por segundo (Bq);

cps= contagem por segundo, que é a área do pico dividido pelo tempo de contagem;

a= abundância dos raios - γ do radionuclídeo (%);

ε= eficiência do detector, utilizando fontes calibradas de ^{60}Co, ^{137}Cs e ^{152}Eu.

5.3.4 – Controle Químico

A determinação dos metais considerados como impureza química das soluções contendo ^{67}Ga e ^{68}Ga foram realizadas através da técnica de espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES, Varian, Vista – MPX) (FIG. 25).

FIGURA 25 - Espectrômetro de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (DIRF-IPEN/CNEN-SP)

Para calibração do ICP-OES foram utilizadas soluções padrões de Cu, Ge, Fe, Ni, Ti e Zn (padrões certificados de 1000 μg/mL) (Merck, Alemanha). O Ge, Fe, Ti e Zn são os principais contaminantes presentes na eluição do ^{68}Ga, já o Cu, Ni, Fe e Zn são os principais contaminantes resultantes da produção do ^{67}Ga (Certificado de Análise da MDS Nordion®). As curvas de calibração destes elementos tiveram as seguintes concentrações: 0,02 - 0,04 - 0,06 - 0,08 - 1,0 μg/mL. Todos os padrões foram diluídos em HNO_3 3%.

5.3.4.1 – Fundamentos Teóricos da Espectrometria por Emissão Atômica

Na década de 70, a técnica de espectrometria de emissão atômica com fonte de plasma teve grande desenvolvimento (Skoog, 1985). Ela é baseada no conceito de que cada átomo ou íon tem estados de energia característicos. Quando excitados, estes

elétrons tendem a voltar ao estado fundamental emitindo energia na forma de fótons. Há muito tempo, utiliza-se a técnica para identificar qualitativamente átomos através da exposição de um metal na forma de um sal sob aquecimento (bico de Bunsen) e aparecem cores características de cada metal. Se houver um meio de dispersão adequado, surgem diversas linhas com cores características para cada metal (Jeffery, 1992). Estas espécies, quando estão em níveis excitados, produzem fótons com comprimento de onda para serem detectados por um sensor específico. Esta etapa do processo de análise é chamada de atomização, em que a amostra, geralmente na forma líquida, é volatilizada e decomposta de tal forma que produza íons e átomos em fase gasosa (Skoog, 2004).

O plasma é uma mistura de gases condutores, com uma concentração de cátions e elétrons em temperatura elevada, como 10.000K. O plasma de gás argônio usado nesta técnica, seus íons e elétrons são os principais condutores da amostra, mas os cátions da amostra também podem contribuir. A amostra é aspirada, o gás e a alta velocidade pulverizam o liquido em gotas finas de diversos tamanhos, que são levadas para dentro do plasma (Skoog, 2004).

Esta técnica determina qualitativamente e quantitativamente diversos elementos, em ordem de µg/mL. Um método rápido e de alta sensibilidade, por existirem poucas interferências, devido à alta velocidade dos íons e átomos, à faixa do espectro, à alta temperatura atingida e dessolvatação e vaporização da amostra (Oliveira e Clain, 2010; Skoog, 2004).

5.3.5 – Produção do ^{65}Zn

Dentre todas as impurezas analisadas (Cu, Fe, Ge, Ni, Ti e Zn), a mais abundante nas amostras de $^{67/68}$Ga antes e após o processo de purificação foi Zn em

todos os experimentos, bem como em alguns reagentes. Para acompanhar o comportamento químico do Zn foi preparado um traçador radioativo, o ^{65}Zn.

Amostras de Sulfato de Zinco Heptahidratado (1g, $ZnSO_4.7H_2O$) foram irradiadas em Eppendorf® dentro de invólucro de alumínio (7cm de altura, 2,1cm de diâmetro) em posições selecionadas no reator nuclear IEA-R1 no IPEN-CNEN/SP (FIG. 26). O fluxo de nêutrons foi de 1,0 $x10^{13}$ $n.s^{-1}.cm^{-2}$ durante uma hora.

FIGURA 26 - Reator Nuclear IEA-R1 (IPEN-CNEN/SP)

O ^{65}Zn possui $T_{1/2}$=5880 horas e o pico de energia gama mais abundante (48%) é 1115keV. A meia vida longa e o gama com energia diferente do ^{68}Ga permite que ambos os radioisótopos possam ser mensurados em uma mesma solução. A atividade do ^{68}Ga foi medida logo após a finalização do processo de purificação em um calibrador de dose (Capintec®). A atividade do ^{65}Zn foi medida no detector de germânio hiperpuro.

5.3.6 – Purificação da Água

A resina Chelex 100® foi usada para purificar a água proveniente do purificador Elix®. A água e a resina ficaram em agitação por no mínimo duas horas a seguir a água foi filtrada em filtro de 0,22µm. Foi avaliada a eficiência do processo através da técnica de ICP-OES (item 5.3.2).

5.3.7- Purificação do $^{67/68}$Ga

Foram estudados diversos métodos de purificação do $^{67/68}$Ga, sendo o ^{68}Ga proveniente do sistema de geradores de ^{68}Ge-^{68}Ga. Os métodos mais promissores foram: a purificação em resina catiônica baseada no trabalho de Zhernosekov *et al* (2007), a purificação através da extração por solventes baseada nos trabalhos de Fryxell e Nachtrieb (1949) e Brown (1971) e a separação química de amino – complexos em resina catiônica (Abrão, 1972).

5.3.7.1 – Purificação do $^{67/68}$Ga através da Troca Iônica

O início da tecnologia moderna de troca iônica ocorreu em 1935, através do uso de polímeros orgânicos sintéticos, mas desde 1850 Way e Thompson observaram a capacidade do solo em remover íons de amônia e de potássio das soluções. Iniciou-se então um processo para encontrar trocadores iônicos inorgânicos. Em 1917, Folin e Bell descreveram a primeira tentativa do emprego de trocadores iônicos para resolver problemas de natureza bioquímica, para a determinação do teor de amônio na urina. Em 1935, começaram a ser produzidas resinas de troca iônica que apresentavam resultados mais eficientes (Collins, Braga e Bonato, 2006).

Em 1942, D' Alelio sintetizou resinas com base no grupo estireno cruzado com o grupo divinilbenzeno, produzindo a primeira resina monofuncional, fortemente ácida (Rieman e Walton, 1970). A partir de então, novas resinas de diferentes tipos foram sintetizadas. Isto se constituiu em um grande avanço nos processos de troca iônica (Santos, 1991).

Basicamente, as resinas sintéticas são sólidos formados por uma matriz polimérica e de grupos ionizáveis quimicamente ligados à sua estrutura. A copolimerização do estireno e divinilbenzeno, seguida da sulfonação, resulta na formação de resinas de troca iônica fortemente ácida (troca catiônica), enquanto que a clorometilação, seguida da reação com uma amina terciária, produz resinas de troca iônica fortemente básicas (troca aniônica) (FIG. 27) (Mantoura e Riley, 1975).

As resinas de troca iônica sintéticas devem ter sua estrutura molecular aberta e permeável de modo que os íons do solvente possam se mover livremente e para que a troca seja efetuada com rapidez suficiente (Rieman e Walton, 1970; Mantoura e Riley, 1975). De acordo com Collins, Braga e Bonato (2006): “na cromatografia por troca iônica, a fase estacionária é altamente carregada, e solutos com cargas de sinais contrários a esta são seletivamente adsorvidos da fase móvel.”

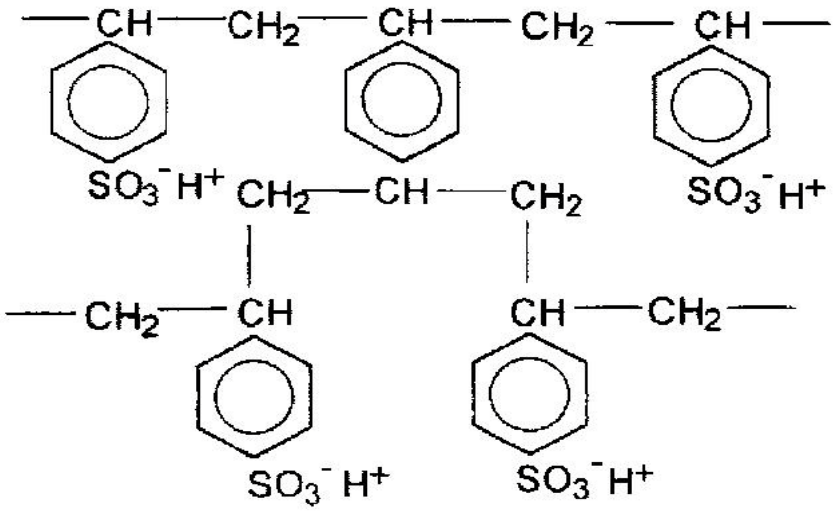

FIGURA 27 – Estrutura química de uma resina de troca catiônica típica

As resinas de troca catiônica contêm cátions livres que podem ser trocados por cátions da solução, como por exemplo, no caso do Ga:

(eq. 3)

$$\left(\overline{R}Na\right)_3 + Ga^{3+} \leftrightarrow \overline{R}_3Ga + 3Na^{1+}$$

A primeira parte do grupo é fixada ao esqueleto da resina por uma ligação covalente formando um tipo de macro-íon. Os íons de cargas opostas são ligados ao macro-íon por forças eletrostáticas, sendo denominados de contra-íons. Estes contra-íons fazem parte do grupo funcional e podem ser trocados por uma quantidade equivalente de vários íons, de forma a manter a eletroneutralidade (Mantoura e Riley, 1975).

As propriedades físicas das resinas são determinadas pelo grau de reticulação. Uma resina altamente reticulada geralmente é mais dura, mais quebradiça e menos permeável que uma resina de baixa reticulação; sendo assim, o grau de reticulação

determina a capacidade de intumescimento e a velocidade de troca iônica (Mantoura e Riley, 1975).

Uma reação de troca iônica consiste na troca reversível de íons entre duas fases imiscíveis. Vários fatores são envolvidos no processo de troca iônica, dentre eles destacam-se o tamanho das partículas, o tipo de troca, o fluxo e a temperatura (Mantoura e Riley, 1975).

A capacidade de troca e a seletividade são as principais características de uma resina, sendo a capacidade de troca expressa como uma medida da quantidade máxima de contra-íons a serem trocados enquanto que a seletividade está relacionada com o grupo funcional, o grau de ligações cruzadas e a própria capacidade de troca (Mantoura e Riley, 1975).

5.3.7.1.2 – Estudos de Purificação do $^{67/68}$Ga em Resina de Troca Catiônica

Os estudos de purificação em resina catiônica foram baseados no trabalho de Zhernosekov *et al* (2007), que foi desenvolvido a partir de estudos realizados por Strelow *et al* (1971). A base do método consiste em uma cromatografia de troca iônica, em que o ^{68}Ga é eluído em uma mistura de acetona/ácido (98:2)%. De acordo com Strelow *et al* (1971) a acetona promove a formação de complexos de cloretos, mais forte que o etanol e, portanto, promove condições favoráveis de separações em pequena quantidade de solvente. Eles mostraram o coeficiente de distribuição de 54 cátions em uma mistura de HCl/acetona percolado em uma coluna contendo resina catiônica, em que as concentrações de HCl variaram entre HCl 0,1 – 3,0 molL^{-1} e a quantidade de acetona entre 0-95%. Na TAB. 8, é possível observar que o Ga possui um coeficiente de distribuição maior em relação ao Zn e ao Fe em uma mistura de solução de acetona e HCl 0,1 molL^{-1} (95:5)%.

TABELA 8- Coeficiente de Distribuição de vários metais em HCl 0,1 $molL^{-1}$ e acetona, variando a proporção de acetona (0-95%) (Strelow *et al*, 1971)

Elemento	**Proporção de Acetona (%)**						
	0	20	40	60	80	90	95
Cu^{2+}	990	1510	2450	3210	578	16,7	0,9
Fe^{2+}	904	1440	3740	$\sim 10^{-4}$	985	40,2	2,4
Fe^{3+}	$>10^{-4}$	$>10^{-4}$	$>10^{-4}$	$>10^{-4}$	28,6	2,4	0,5
Ga	$>10^{-4}$	$>10^{-4}$	$>10^{-4}$	$>10^{-4}$	1610	6,6	5,0
Zn	1010	939	848	380	7,6	2,4	1,2

O método de purificação e pré-concentração do ^{68}Ga na coluna cromatográfica, foi baseado no trabalho de Zhernosekov *et al* (2007) e envolveu a percolação das seguintes soluções:

- O eluído do gerador de $^{68}Ge/^{68}Ga$ (5-7 mL em HCl 0,1 $molL^{-1}$) foi percolado pela resina;
- 1 mL da solução de acetona/HCl 0,05 $molL^{-1}$ (80/20)%, chamada de solução N_1, foi usada para remover o ^{68}Ge e outras impurezas da coluna cromatográfica;
- 1 – 0,4 mL da solução de acetona/HCl 0,05 $molL^{-1}$ (98/2)%, chamada N_2, foi usada para eluir o ^{68}Ga;
- 1 mL de HCl 4 $molL^{-1}$, para recondicionar a coluna e remover as impurezas adsorvidas, como Ti;
- 1 mL de água, para lavar a coluna.

Segundo Zhernosekov *et al* (2007), para se obter uma alta eficiência da eluição do ^{68}Ga é necessário adicionar 150μL de N_2 na coluna, e aguardar cerca de 2 minutos

de contato da solução N_2 para completa deadsorção do ^{68}Ga da coluna. Posteriormente, são adicionados mais 250μL de N_2 para remover o restante do ^{68}Ga, tendo o volume final de 400μL. Entre uma solução e outra, foi passado ar na coluna para remover o volume restante das soluções. Este processo de purificação está esquematizado na FIG. 28.

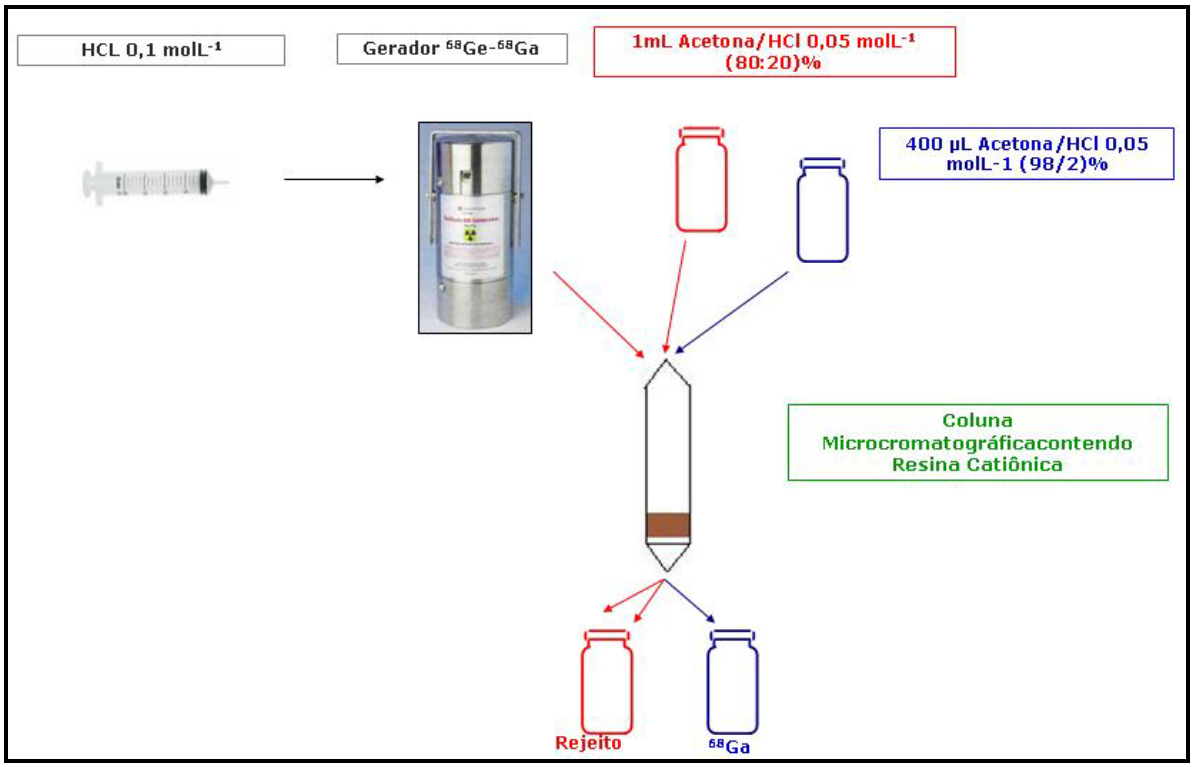

FIGURA 28 – Esquema Básico de Eluição e Purificação do gálio, baseado no trabalho de Zhernosekov *et al* (2007)

5.3.7.1.3 – Escolha da Coluna Cromatográfica

A resina catiônica usada no trabalho de Zhernosekov *et al* (2007) foi a AG50W-X8 (>400 mesh) em uma coluna cromatográfica (500μL, ~ 2 mm de diâmetro, ~5 mm de comprimento). Esta resina não está comercialmente disponível. Por este motivo,

nos experimentos iniciais foi usada a resina catiônica AG50W-X8, 200-400 mesh, que também foi usada no trabalho de Strelow *et al* (1971).

Os modelos de coluna cromatográficas empregados no presente trabalho estão representados na FIG. 29, seguindo os parâmetros de altura e diâmetro.

FIGURA 29 – Modelos de coluna usada para a eluição do ^{68}Ga: coluna de vidro com placa porosa G2, seringa padrão de 1mL, Micropipeta plástica da esquerda para a direita

5.3.7.1.4– Estudo Comparativo da ativação da resina catiônica com ácido/base e ácido

As resinas comerciais podem apresentar impurezas orgânicas, como monômeros e polímeros de baixo peso molecular usados na síntese, entre outras. Para fazer uso destas resinas, é necessário um tratamento prévio (ou ativação), com o uso de ácidos concentrados seguida da percolação com ácido diluído; tratamento alternado de base-água-ácido; tratamento com metanol, etanol e/ou acetona para remover a matéria orgânica. Além disso, realizar um tratamento prévio para melhora do processo de purificação também é utilizado (Abrão, 1972).

A resina deve ser previamente condicionada com, geralmente, o solvente que irá promover a troca iônica, após a ativação. No condicionamento da resina é importante considerar a seletividade de íons com relação ao grupo funcional da resina, devido a diferenças na afinidade de vários íons para a resina (Santos, 1991).

Assim, foram realizados os estudos de influência da ativação da resina catiônica em relação à redução de impurezas e o rendimento de eluição. As resinas foram ativadas com HCl 0,1 $molL^{-1}$ e NaOH 0,1 $molL^{-1}$ e apenas com HCl 0,1 $molL^{-1}$.

As resinas escolhidas foram a AG50W-X8 (200-400 mesh) e a AG50W-X8 (>400 mesh, doação) em micropipeta plástica. O ^{68}Ga foi eluído com 400μL da solução N_2 em todos os experimentos.

5.3.7.1.5– Estudo Comparativo de Resinas Catiônicas comercialmente disponíveis em relação à AG50W-X8 (>400 mesh)

A resina catiônica AG50W-X8 (>400 mesh) usada no trabalho de Zhernosekov *et al* (2007) não é comercialmente disponível. Por este motivo, foram analisadas diversas resinas catiônicas e os resultados foram comparados aos obtidos com a resina AG50W-X8 (>400 mesh). As resinas comerciais usadas foram:

- AG50W-X2 (100- 200 mesh),
- AG50W-X4 (100-200 mesh),
- AG50W-X4 (200- 400 mesh),
- AG50W-X8 (200- 400 mesh),
- AG50W-X12 (100-200 mesh).

Todos os experimentos seguiram os mesmos parâmetros. O suporte usado como coluna cromatográfica foi a micropipeta, em que foi adicionado 50μL de resina.

Para ativar a resina foram usados 10mL de HCl 0,1 $molL^{-1}$. Em cada experimento foi percolado 1,5mL de solução de HCl 0,1 $molL^{-1}$ contendo ^{68}Ga, proveniente do gerador de ^{68}Ge -^{68}Ga; 1mL de solução N_1, 400µL de solução N_2 e 1mL de solução de HCl 4 $molL^{-1}$ e 1mL de H_2O.

Posteriormente foi analisada a porcentagem da impureza radionuclídica, ou seja, o ^{68}Ge na amostra de solução N_2 em que se encontra o ^{68}Ga percolado da coluna cromatográfica, assim como também foram analisadas as principais impurezas químicas: Fe, Ge, Ti e Zn, através da técnica de ICP-OES.

5.3.7.1.6– Estudo de Purificação do ^{68}Ga Usando as Menores Partículas das Resinas AG50W-X4 (200-400 mesh) e AG50W-X8 (200-400 mesh)

O estudo de purificação do ^{68}Ga seguiu a mesma metodologia do item anterior, ou seja, ativação de 50µL de resina (AG50W-X4, 200-400 mesh e AG50W-X8, 200-400 mesh) com 10mL de HCl 0,1 $molL^{-1}$, uso da micropipeta como suporte cromatográfico e a deadsorção do ^{68}Ga com 400µL de solução de N_2 (5.3.7.1.2). Porém, as resinas foram previamente lavadas com H_2O e as partículas suspensas, ou seja, as menores partículas foram recolhidas e usadas neste experimento. Esta foi uma alternativa visando usar partículas semelhantes às partículas da resina AG50W-X8 com tamanho >400mesh.

5.3.7.1.7- Purificação do ^{68}Ga na presença de ^{65}Zn em Resina Catiônica

Neste experimento foi estudado o comportamento do ^{65}Zn na purificação do ^{68}Ga em resina catiônica (item 5.3.5). Foi adicionado ao eluato (^{68}Ga, HCl 0,1 $molL^{1}$) 0,77 mg de Zn (^{65}Zn). As resinas catiônicas utilizadas foram a AG50W-X8

(50µL, H^+, 200-400mesh) e a AG50W-X4 (50µL, H^+, 200-400mesh) em micropipeta plástica usada como suporte.

5.3.7.2– Purificação do $^{67/68}$Ga por Extração por Solventes

Mihaylov e Distin (1992) relataram o grande interesse pelo desenvolvimento do processo de recuperação do gálio metálico no final dos anos 70, devido aos chips de computadores feitos de arseneto de gálio (material semicondutor) em silicone serem muito mais rápidos. Por este motivo, foram desenvolvidos métodos de extração do gálio de elementos como alumínio, zinco e ferro, já que a quantidade de gálio em comparação com os outros metais era bem menor.

Um destes métodos descritos é a extração por solventes, em que o gálio é rapidamente extraído em solução forte ácida. Desde 1924, Swift (1924) mostrou que é possível extrair o gálio (em HCl 6 $molL^{-1}$) para o meio orgânico, em éter dietílico. A presença do HCl 6 $molL^{-1}$ promove a formação de $HGaCl_4$ extraído por solvatação. Abaixo desta concentração de H^+, há uma redução da recuperação do gálio. Entretanto, o Fe pode também ser extraído, como $HFeCl_4$.

Posteriormente, Fryxell e Nachtrieb (1949) estudaram a extração do gálio em éter diisopropílico com a recuperação máxima em HCl 6 $molL^{-1}$. Brown (1971) estudou a separação química do ^{67}Ga dos alvos de Zn, baseado no trabalho de Fryxell e Nachtrieb (1949). Ao invés das 12 horas do método anterior, Brown (1971) reduziu o tempo de processo para 2 horas. Além disso, ele adicionou Cloreto de Titânio ($TiCl_3$) para reduzir o Fe^{3+} para Fe^{2+}, já que o Fe^{3+} também pode ser extraído por este sistema de purificação (Swift, 1924).

5.3.7.2.1- Extração por Solventes – Líquido-Líquido

O segundo método de purificação deste trabalho foi a extração por solventes convencional usando éter diisopropílico baseado no trabalho de Brown (1971). O ^{67}Ga foi diluído em 3,5mL de HCl 7 $molL^{-1}$ e extraído três vezes com éter diisopropílico. A solução resultante, 10,5mL de éter diisopropílico contendo ^{67}Ga, foi equilibrada três vezes com água deionizada para extrair o ^{67}Ga da fase orgânica. Outro estudo foi realizado usando esta mesma metodologia com o objetivo de reduzir o volume final de água deionizada para recuperação do ^{68}Ga.

5.3.7.2.2- Cromatografia de Extração por solventes

As resinas XAD (Amberlite) fazem parte do grupo de resinas esféricas e poliméricas porosas que diferem entre si na composição química, grau de polaridade, porosidade e área superficial. Estas resinas apresentam propriedades físicas como distribuição uniforme dos poros e grande área superficial, além de estrutura química não-iônica. As principais características são: a resina é de fácil regeneração, boa seletividade e estabilidade química e mecânica (Ferreira, 2007).

Zini (2010) estudou no IPEN/CNEN-SP, o tratamento do resíduo do processamento de diferentes concentrados de tório obtidos do tratamento químico da monazita com intuito da obtenção de compostos de tório de pureza nuclear. Este resíduo contém tório e terras raras. Foi realizada a cromatografia de extração, onde o agente extrator fosfato de tri-n-butila foi suportado em resinas poliméricas XAD 16, em que se mostrou um método eficiente para a recuperação de tório.

Baseado nos conceitos de Brown (1971) e Zini (2010), a metodologia realizada no item anterior, foi transferida para uma coluna de extração cromatográfica em que o éter diisopropílico foi adsorvido na resina XAD-16 (20-60 mesh). Esta resina foi

previamente lavada uma única vez com etanol e água. Em um grama de resina seca foi adicionado 1,4mL de éter diisopropílico que permaneceu em contato durante 24h, a 4ºC.

Uma coluna de vidro de 10mm com placa porosa (G2) foi a primeira a ser utilizada. Com o objetivo de melhorar os resultados uma micropipeta plástica também foi usada nestes experimentos (FIG. 30).

FIGURA 30– Modelos de colunas usadas para a purificação do $^{67/68}$Ga: Micropipeta plástica (Sigma-Aldrich®, EUA) e coluna de vidro com placa porosa G2 (da esquerda para a direita)

A FIG. 31 mostra como foi esquematizado o processo de eluição e purificação do ^{68}Ga. O gerador de ^{68}Ge/^{68}Ga foi eluído com HCl 0,1 molL^{-1} e HCl concentrado foi adicionado até se obter a concentração de HCl 7 molL^{-1}. Esta solução foi percolada na coluna contendo a resina XAD-16 contendo éter diisopropílico. Para a deadsorção do ^{68}Ga, água deionizada foi percolada pela coluna.

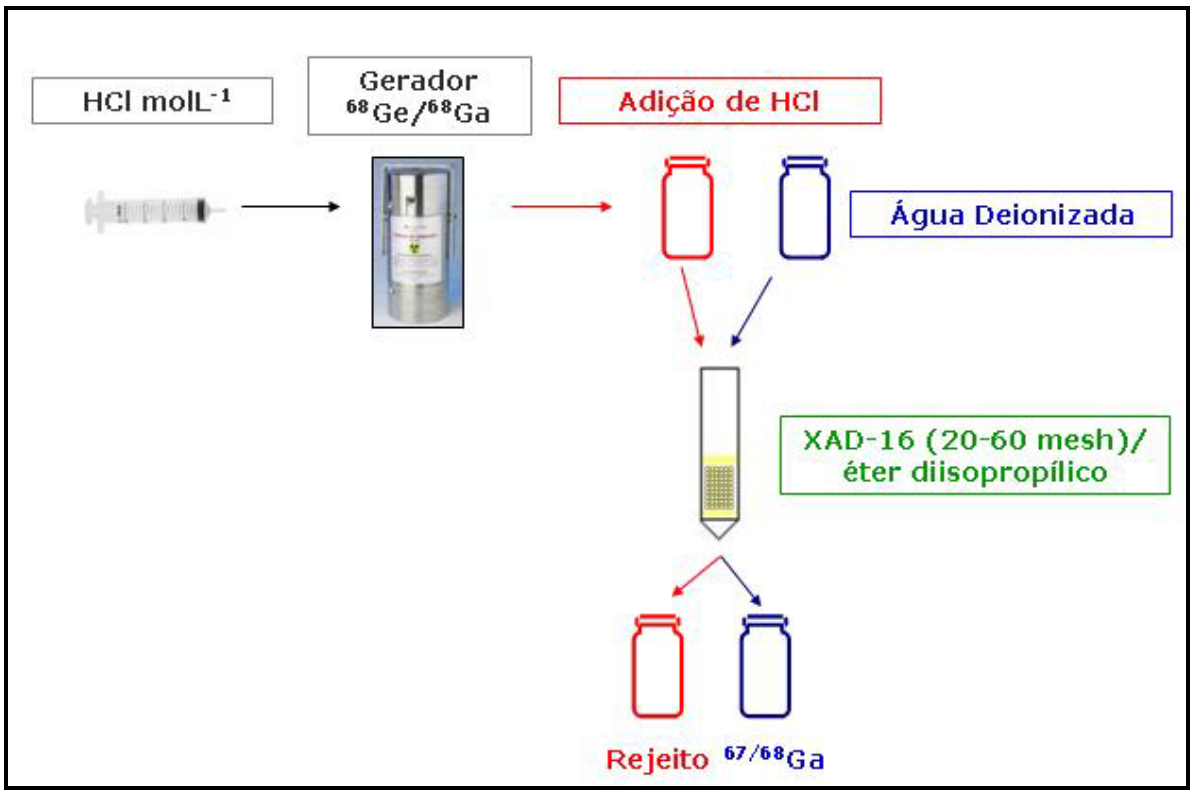

FIGURA 31 – Purificação do $^{67/68}$Ga usando coluna cromatográfica de extração

A grande vantagem deste método é purificar o $^{67/68}$Ga e retomá-lo em água. Porém, em solução aquosa, o Ga se mantém estável na forma de hidróxido de gálio. O ideal para realizar marcações é que o Ga esteja na forma ionizável, ou seja, Ga^{3+}. Por isso, este mesmo método de purificação foi realizado e o ^{68}Ga foi retomado em HCl 0,05 molL^{-1}.

No trabalho de Brown (1971), foi adicionado o $TiCl_3$ na solução contendo gálio antes da purificação com o objetivo de reduzir o Fe^{3+} para Fe^{2+}, pois a química do Ga^{3+} e Fe^{3+} é similar. Entretanto, o Ti é um metal considerado uma impureza. Por este motivo, foi usado uma solução de NaI 1%, menos efetiva que o $TiCl_3$ no processo de redução. A purificação do ^{68}Ga foi comparada com e sem a adição dos agentes redutores.

5.3.7.2.2.1– Purificação do ^{68}Ga por Extração por Solventes em Coluna Cromatográfica na presença de ^{65}Zn

Neste estudo, o objetivo também foi avaliar o comportamento do ^{65}Zn na purificação do ^{68}Ga por extração por solventes em coluna cromatográfica. Foi adicionado 0,77mg de Zn (^{65}Zn) na solução inicial contendo ^{68}Ga (HCl 7 mol.L^{-1}) para ser percolado em coluna de extração cromatográfica em que o éter diisopropílico foi adsorvido na resina XAD-16 (243mg, 20-60 mesh). Como suporte foi usada uma coluna de vidro de 10mm e diâmetro com placa porosa (G2).

5.3.7.2.2.3–Determinação do Coeficiente de Distribuição do Ga e Zn

O objetivo deste estudo foi avaliar qual a melhor concentração inicial de HCl para purificar o ^{68}Ga por extração em coluna. Para determinar o coeficiente de distribuição do Ga (^{68}Ga) e Zn (^{65}Zn) [0,77mg de Zn (^{65}Zn)] as concentrações de HCl nas soluções iniciais contendo Ga e Zn foram ajustadas para: 0,1 molL^{-1}, 3 molL^{-1}, 5 molL^{-1}, 7 molL^{-1}, 9 molL^{-1} e 12 molL^{-1}. Como suporte, foi usada coluna de vidro 10mm com placa porosa (G2), contendo a resina XAD-16 (~243mg, 20-60 mesh) contendo éter diisopropílico (5.3.7.2.2).

5.3.7.3 - Purificação do ^{68}Ga por Resina Catiônica em Meio Básico

De acordo com Abrão (p. 72, 1972): “o gálio pode ser separado de Ni, Cu e Zn em resina catiônica Estireno – Butadieno – Estireno em meio NH_4, os amino – complexos sendo retidos na resina catiônica, enquanto o gálio (anfótero) passa no efluente, como hidróxido complexo aniônico.”

No livro escrtio por Abrão (1972), não é foi citado nenhum experimento com gálio em resina catiônica em meio básico. Baseado apenas no conceito citado, foi desenvolvida uma metodologia de purificação do ^{68}Ga em resina catiônica Dowex 50W – X8 (100-200 mesh) em meio básico.

Os experimentos foram realizados em micropipeta plástica. Foi adicionado 100µL de resina previamente condicionada com 10mL de NH_4OH 0,1 $molL^{-1}$. Foi retirada uma alíquota de 1mL de ^{68}Ga em HCl 0,1 $molL^{-1}$ (proveniente do gerador de ^{68}Ge-^{68}Ga), levada à secura e retomada em 1mL de NH_4OH 0,1 $mol.L^{-1}$ e adicionado 20µg de ^{65}Zn. Posteriormente, foram percolados 5mL de NH_4OH 0,1 $molL^{-1}$ e 5mL de HCl 0,1 $molL^{-1}$. O esquema ilustrado na FIG. 32 mostra como foi realizado este experimento.

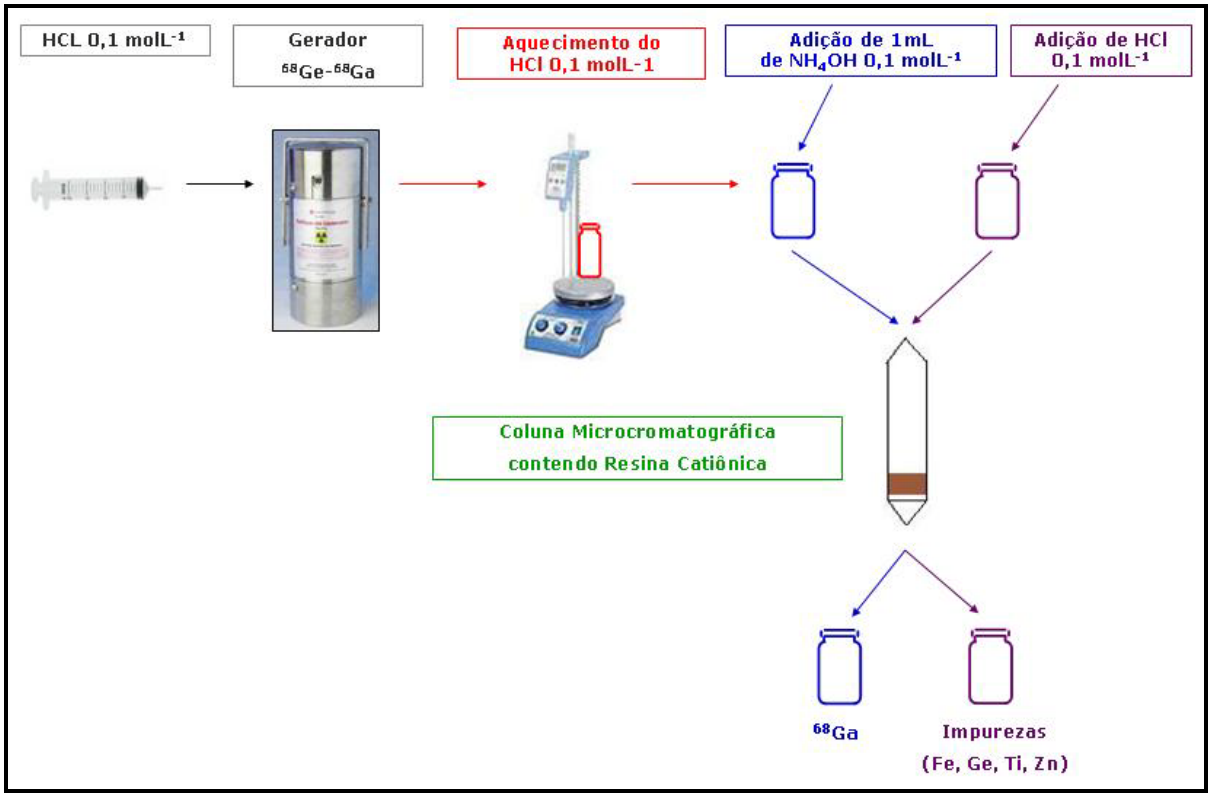

FIGURA 32 – Esquema de purificação do ^{68}Ga em resina catiônica em meio básico

5.3.8- Marcação do DOTATOC e DOTATATO com ^{68}Ga

A primeira biomolécula disponível para a marcação com radioisótopos na DIRF (IPEN/CNEN-SP) foi o DOTATOC, porém não é mais comercializado. Por isso, uma outra biomolécula foi introduzida, o DOTATATO. Forrer *et al* (2004) realizaram um estudo farmacocinético *in vivo* comparando estas duas biomoléculas marcadas com ^{111}In. Apesar da qualidade da imagem ter algumas limitações (SPECT), o estudo mostrou que ambos radiofármacos possuem alta captação específica nos receptores da somatostatina.

5.3.8.1- Marcação do DOTATOC com ^{68}Ga em meio acetona/HCl

Este experimento foi realizado no início do trabalho, como um método de controle de qualidade do processo de purificação, antes da introdução da técnica de ICP-OES no presente trabalho.

Foi realizada a marcação do DOTATOC com ^{68}Ga purificado, baseada no trabalho de Zhernosekov *et al* (2007). Após a purificação realizada em resina catiônica (AG50W-X8 200-400 mesh), a solução contendo ^{68}Ga (acetona/HCl) (5.3.7.1.2) foi transferida para um frasco de reação contendo 50μg de DOTATOC diluído em água e aquecido a 98ºC em banho Maria, durante 10 minutos. Posteriormente, o peptídeo marcado foi purificado em um cartucho SepPak C-18 de fase reversa, por 2 vezes. O ^{68}Ga livre foi removido do cartucho com 2mL de água e o ^{68}Ga-DOTATOC foi coletado em 0,8 mL de etanol, como mostra a FIG. 32. A atividade foi medida em um calibrador de dose (Capintec®).

A pureza radioquímica foi determinada por CCD (cromatografia de camada delgada), com dois sistemas: citrato de sódio 0,1 molL^{-1} pH=5,5 (R*f*=0,8-1,0 para ^{68}Ga livre) como fase móvel e TLC-SG como fase estacionária e uma solução de acetato de

amônio 1 molL^{-1}/ Metanol (1:1) (R*f*=0-0,2 para ^{68}Ga coloidal) como fase móvel e ITLC-Al como fase estacionária.

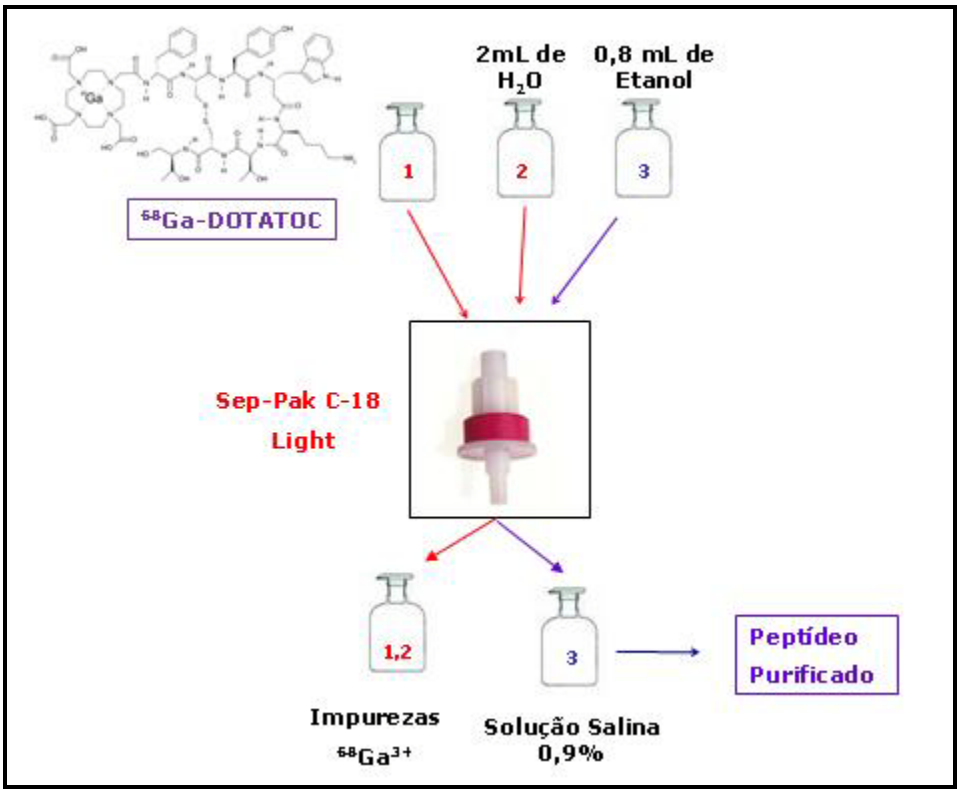

FIGURA 32– Esquema Básico de Purificação do ^{68}Ga-DOTATOC, baseado no trabalho de Zhernosekov *et al* (2007)

5.3.8.2- Marcação do DOTATATO com ^{68}Ga

A marcação do DOTATATO com ^{68}Ga foi baseado no trabalho de Colturato *et al* (2011), em que o ^{68}Ga, após o processo de purificação por cromatografia por extração (item 5.5.2), foi evaporado e retomado em 2mL de solucao tampão (acetato de sódio triidratado + ácido cítrico 2 molL^{-1}, pH 4) para a marcação com 40μg de DOTATATO diluído em água, foi aquecido à 95ºC, durante 7 minutos. O peptídeo marcado foi purificado em um cartucho SepPak C-18 de fase reversa, por 2 vezes. O ^{68}Ga livre foi

removido do cartucho com 2mL de água e o ^{68}Ga-DOTATATO foi coletado em 0,8 mL de etanol.

O mesmo procedimento de marcação do DOTATATO com o ^{68}Ga foi realizado após a purificação em resina catiônica em que o ^{68}Ga purificado é recuperado em meio básico (5.3.7.3). A solução de NH_4OH 0,1 $molL^{-1}$ foi evaporada e retomada em 100µL de HCl 0,1 $molL^{-1}$, para que o ^{68}Ga esteja na forma química ionizável (Ga^{3+}). Esta solução foi adicionada ao frasco de reação à 95^{o}C com a solução tampão (acetato de sódio triidratado + ácido cítrico 2 $molL^{-1}$, pH 4) e 40µg de DOTATATO diluído em água. O tempo de reação foi de 7 minutos.

Para comparar os resultados de marcação com o DOTATATO, o ^{68}Ga foi eluído do gerador de ^{68}Ge-^{68}Ga e diretamente marcado com o DOTATATO nas mesmas condições citadas no parágrafo anterior.

A pureza radioquímica para todas as marcações foi determinada através do mesmo sistema citado no item anterior.

6. RESULTADOS E DISCUSSÕES

6.1 - Gerador de $^{68}Ge/^{68}Ga$

Foi realizada a eluição fracionada do gerador de $^{68}Ge/^{68}Ga$ adquirido em 2008, como mostram a FIG.34 e a FIG. 35 . Com um volume de 7 mL é possível obter um valor de 94,0% da atividade total de ^{68}Ga eluída e a partir deste valor não se observou um aumento significativo da atividade por volume.

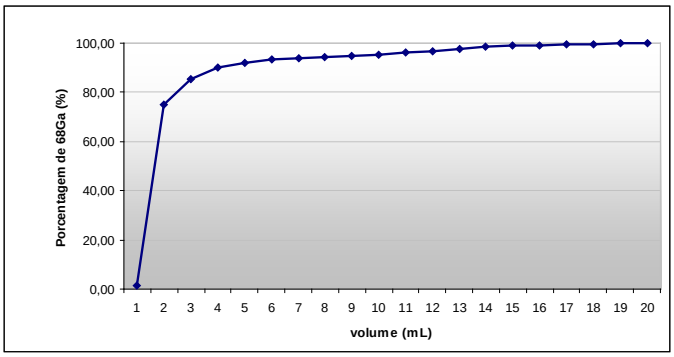

FIGURA 34- Curva de Eluição do ^{68}Ga proveniente do gerador de $^{68}Ge/^{68}Ga$ (%^{68}Ga eluído por mL)

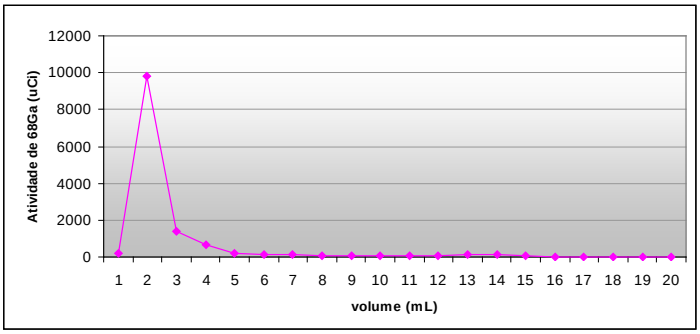

FIGURA 35- Curva de Eluição do ^{68}Ga proveniente do gerador de $^{68}Ge/^{68}Ga$ (atividade de ^{68}Ga por mL)

As FIGs. 36 e 37 mostram a eficiência dos geradores de ^{68}Ge-^{68}Ga, adquirido em 2008 e 2011, respectivamente. Todas as eluições foram manuais, o que pode influenciar no rendimento do gerador.

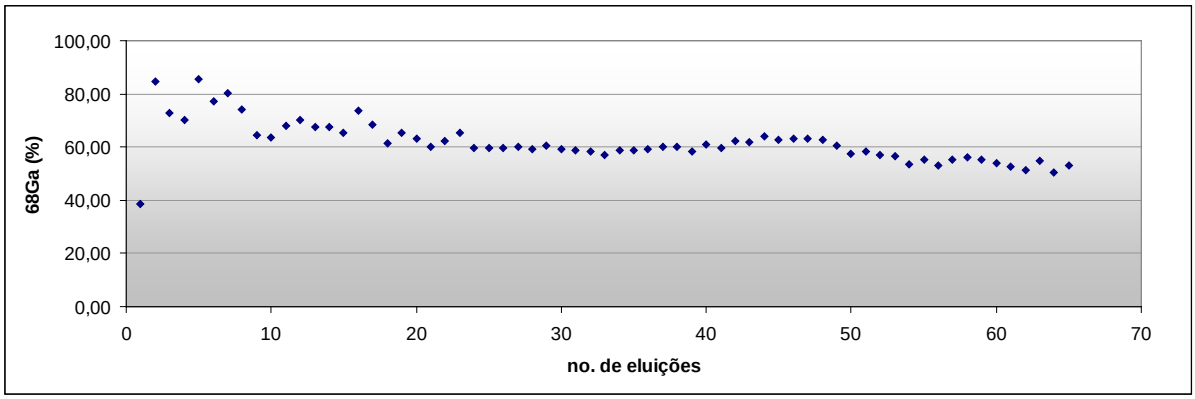

FIGURA 36 - Eficiência de Eluição do gerador de ^{68}Ge/^{68}Ga entre os meses de Outubro/2008 até Março/2011 (29 meses)

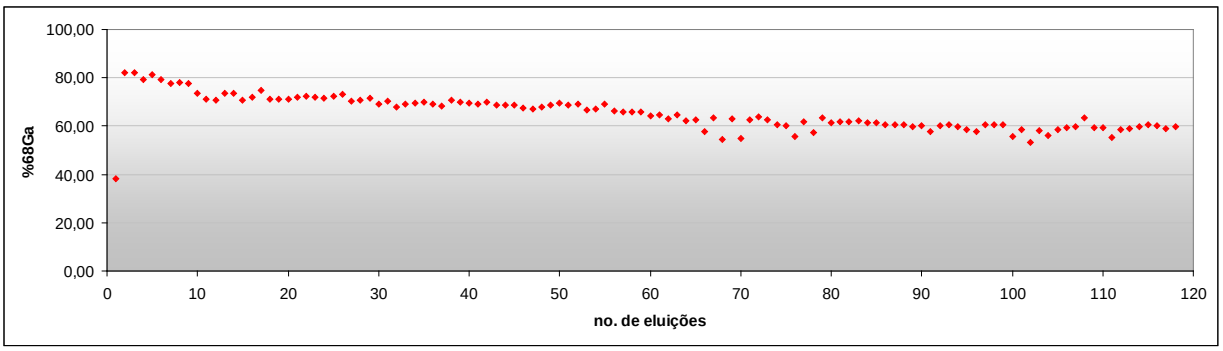

FIGURA 37 - Eficiência de Eluição do gerador de ^{68}Ge/^{68}Ga entre os meses de Abril/2011 até Fevereiro/2012 (10 meses)

Em ambos os geradores de ^{68}Ge-^{68}Ga há um decréscimo da eficiência devido ao tempo de uso, apesar destes valores estarem de acordo com as especificações do fabricante.

O gerador de ^{68}Ge-^{68}Ga usado pelo grupo de Decristoforo *et al* (2007) apresentou um rendimento de (81,7±6)% após 10 dias da data de calibração,

(60,5±3)% e (56,2±4,0)% após 5 meses e 10 meses, respectivamente. O gerador adquirido em 2008 começou a ser utilizado após aproximadamente 180 dias da data de calibração. O rendimento do gerador após 5 meses a partir da primeira eluição foi 63% e após 10 meses, 59% (FIG. 38). O gerador adquirido em 2011 começou a ser utilizado 90 dias após a data de calibração, o rendimento foi superior a 80%. Após 5 meses em uso o rendimento foi 70% e após 10 meses o rendimento foi 63% (FIG. 39). Este valor também está relacionado com o tempo e a velocidade que o gerador é eluído. Decristoforo *et al* (2007) utilizaram um sistema automatizado, enquanto as eluições realizadas neste trabalho foram manuais.

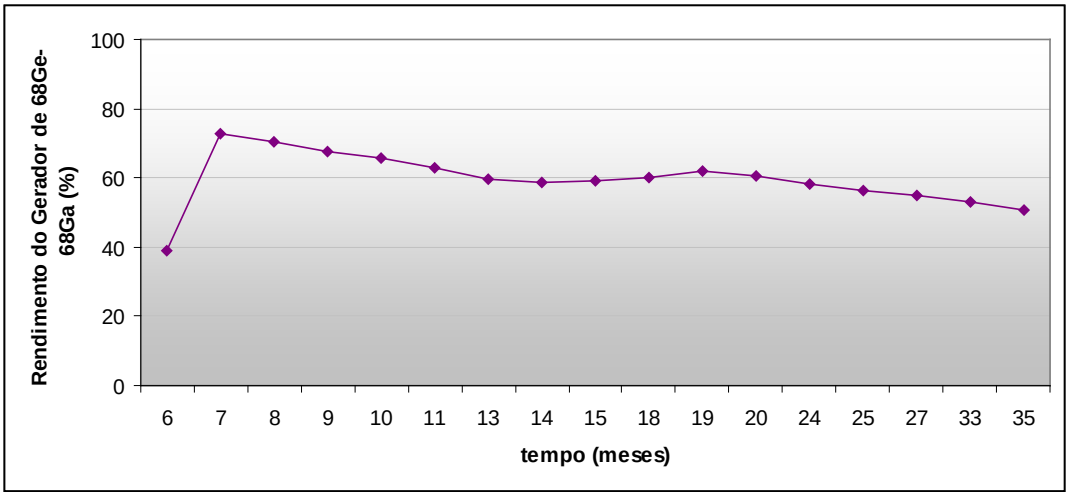

FIGURA 38 - Eficiência de eluição do gerador de $^{68}Ge/^{68}Ga$ (adquirido em 2008) em relação ao tempo de uso

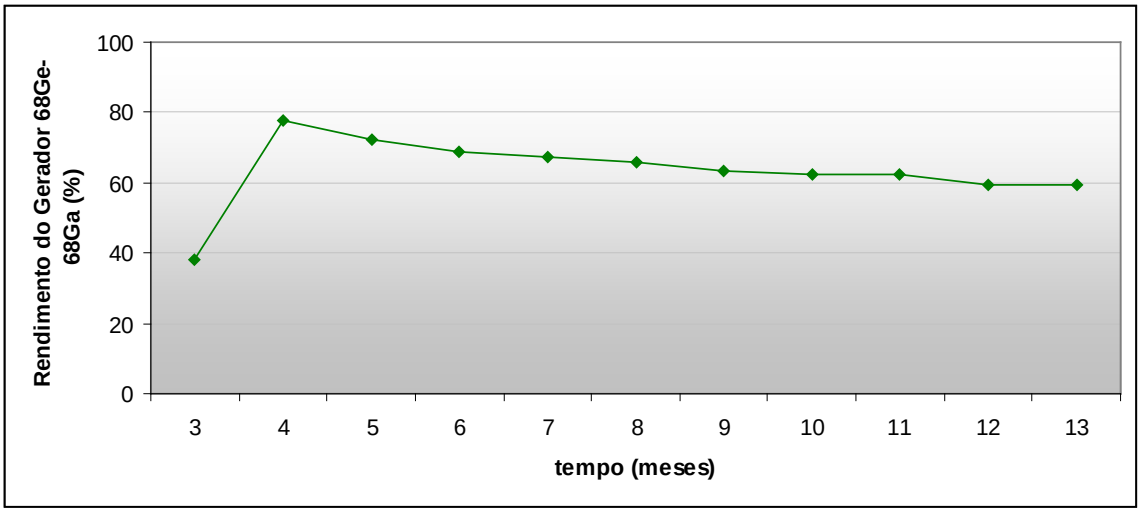

FIGURA 39- Eficiência de eluição do gerador de $^{68}Ge/^{68}Ga$ (adquirido em 2011) em relação ao tempo de uso

No segundo gerador de $^{68}Ge/^{68}Ga$ (2011), foi realizada uma maior quantidade de eluições, pois quanto mais tempo o gerador permanece sem eluições maior a quantidade de impurezas acumuladas. A FIG. 40 mostra que a quantidade total de impurezas metálicas (Fe, Ge, Ti e Zn) foi decaindo ao longo de cinco eluições consecutivas.

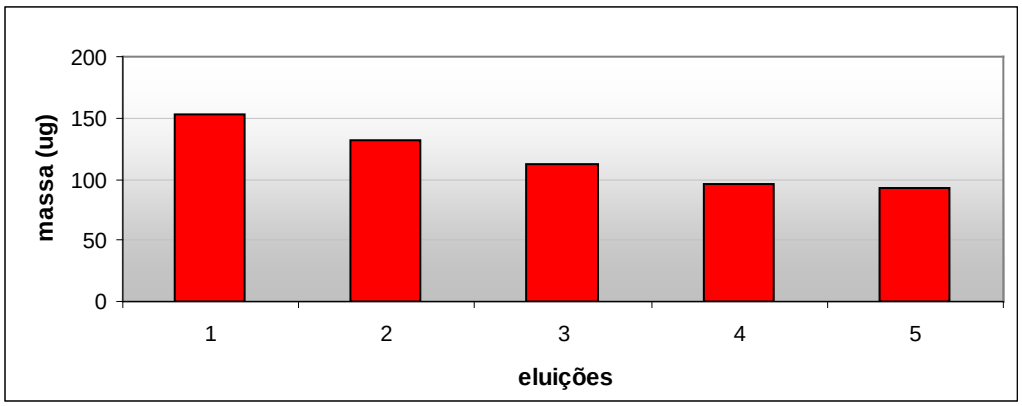

FIGURA 40 - Nível de impurezas total (Fe, Ge, Ti e Zn) do eluato realizadas durante cinco dias consecutivos

6.2 – Irradiação do ^{65}Zn

A atividade específica obtida na irradiação de 1g de $ZnSO_4.7H_2O$ foi de 31,6 MBq $^{65}Zn/gZn$ (854 μCi $^{65}Zn/gZn$), no fim da irradiação com fluxo de nêutrons 0,9 - 1,0 $x10^{13}$ $n.s^{-1}.cm^{-2}$ durante uma hora. Esta atividade foi suficiente para a realização dos experimentos.

6.3 – Purificação da Água

Os resultados mostraram que houve uma redução das principais impurezas, Fe e Zn, de 82±5% e 91±10% (n=3), respectivamente, após a purificação com a resina Chelex 100®. Os outros metais analisados (Cu, Ge, Ti e Ni) não estavam em níveis significantes na água antes da purificação.

6.4 – Presença de Espécies Metálicas Consideradas Contaminantes do Eluato de ^{68}Ga e Reagentes e Controle Radionuclídico

Foram analisadas as impurezas químicas (Fe, Ge, Ti e Zn) e radionuclídica (^{68}Ge) presentes no eluato de ^{68}Ga.

Na técnica de ICP-OES, cada elemento possui uma curva de calibração para a faixa de concentração que se deseja analisar. A faixa de concentração escolhida foi de 0,02 – 0,1 μg/mL (para os elementos Fe, Ge, Ti e Zn). A FIG. 41 mostra um exemplo de curva de calibração do Zn, em que relaciona a intensidade de acordo com a faixa de concentração.

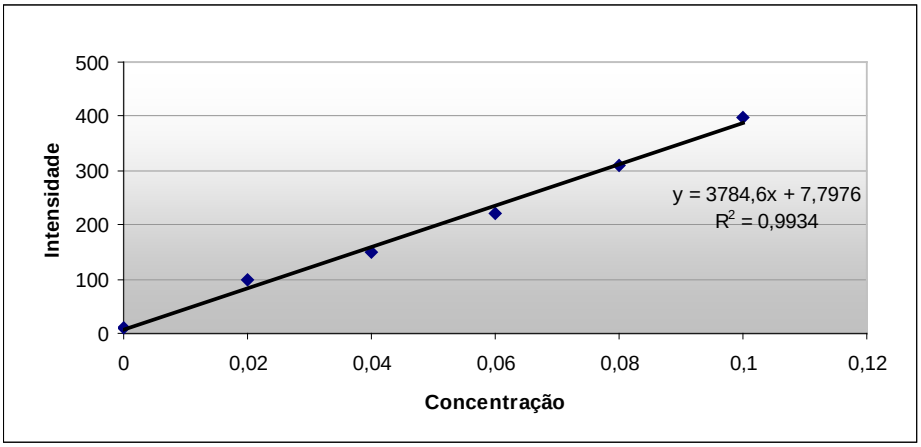

FIGURA 41 – Curva de Calibração do Zn

A TAB. 9 mostra a quantidade (µg) de cada impureza química presente em 5 mL do eluato de ^{68}Ga (HCl 0,1 molL^{-1}), mensuradas através da técnica de ICP-OES em 4 eluições aleatórias realizadas durante 12º mês após o uso do gerador de ^{68}Ge-^{68}Ga.

TABELA 9 – Massa de Impurezas do eluato de ^{68}Ga

	Massa	**do**	**metal (µg)**	
Fe	**Ge**	**Ti**	**Zn**	**Total**
10	70	5	935	1020
5	85	5	930	1025
10	50	5	875	940
5	75	5	995	1080

Estes valores mostram que a massa total de impurezas foi de aproximadamente 1mg, sendo a mais abundante o Zn. Além de ser um produto de decaimento do ^{68}Ga, o Zn também foi encontrado em abundância no principal reagente usado nos experimentos, o HCl. A TAB. 10 mostra a quantidade de cada elemento presente nos reagentes e na água utilizada após passar pelo processo de purificação.

TABELA 10 – Concentração de metais considerados impurezas presentes nos reagentes e na água usados no processo de purificação do ^{68}Ga

	Concentração (µg/mL)			
Reagentes	**Fe**	**Ge**	**Ti**	**Zn**
HCl 0,1 $molL^{-1}$	0,01	0,14	0,01	6,6
H_2O	<0,02	<0,02	<0,02	0,3
Acetona	0,09	<0,02	<0,02	75,3*

* o valor foi bem acima da curva de calibração

A quantidade de ^{68}Ge presente no eluato de ^{68}Ga, do gerador de ^{68}Ge-^{68}Ga adquirido em 2008, foi da ordem de 10^{-2}%, após 3 anos em uso, permanecendo dentro dos limites permissíveis pelo fabricante. O gerador de ^{68}Ge-^{68}Ga adquirido em 2011, apresentou o mesmo valor (10^{-2}%), porém mensurado após 1 ano da data de calibração.

6.5-Purificação do $^{67/68}Ga$

6.5.1 – Purificação do $^{67/68}Ga$ em resina catiônica

6.5.1.2 – Escolha da Coluna Cromatográfica

A primeira coluna cromatográfica utilizada foi de acordo com o trabalho de Zhernosekov *et al* (2007), ou seja, ~ 2 mm de diâmetro e ~5 mm de comprimento. Verificou-se que estas medidas equivalem a uma seringa de 1mL padrão e para impedir a passagem livre da resina foi colocada lã de vidro como base. O problema desta coluna é que a resina não ficava completamente retida nesta base em alguns

experimentos, interferindo nos resultados. Foi trocada por uma coluna de vidro com placa porosa G2. Entretanto, o diâmetro desta coluna é maior que o da seringa, e o rendimento da eluição do ^{68}Ga foi inferior à coluna anterior. Então, uma nova coluna foi utilizada, uma adaptação de uma micropipeta plástica (Sigma-Aldrich®, EUA). Como base, foi usada a lã de vidro, que reteve os grãos da resina, pois a micropipeta é mais afunilada e fina que a seringa. O material plástico é frágil e foi necessário vedar a coluna para impedir o vazamento.

A TAB. 11 mostra uma comparação dos três tipos de colunas e a diferença do rendimento da eluição do ^{68}Ga, com 1mL da solução de acetona/HCl 0,05 molL^{-1} (98/2)%. A primeira coluna estudada, ou seja, a seringa padrão (1mL) foi usado 500µL de resina catiônica AG50W-X8 (200-400 mesh), bem como na coluna de vidro. Apenas na micropipeta foi usado um volume menor (50µL) da mesma resina.

TABELA 11– Diferença do rendimento de purificação do ^{68}Ga em relação ao tipo de coluna utilizada

Tipo de coluna	**Seringa 1mL**	**Coluna de Vidro**	**Micropipeta**
Rendimento da Eluição do ^{68}Ga	83,9%	30,6%	89,4%*

*0,4mL da solução de acetona/HCl 0,05 molL^{-1} (98/2)%

As soluções usadas na purificação do ^{68}Ga permaneceram durante 2 minutos em contato com a resina na coluna cromatográfica, obtendo, assim, melhores resultados de rendimento de purificação naquelas colunas em que o diâmetro e o tempo em contato com a resina foi maior, no caso, a micropipeta e a seringa, em relação a coluna de vidro.

6.5.1.4 – Estudo Comparativo da Ativação da Resina Catiônica com ácido/base e apenas ácido

A TAB. 12 mostra os efeitos das diferentes condições de ativação da resina.

TABELA 12 - Comparação entre o rendimento de purificação do ^{68}Ga e redução das impurezas entre duas diferentes resinas ativadas com ácido/base e apenas com ácido (n=3)

Resina	Mesh	Ativação	% $^{67/68}Ga$ purificado	% redução impurezas
AG50WX8	200-400	Ácido/Base	70±10	81±5
AG50WX8	200-400	Ácido	60±5	97±2
AG50WX8	>400	Ácido/Base	77±6	98±1
AG50WX8	>400	Ácido	86±1	92±10

Não houve uma diferença significativa entre os resultados apresentados para a resina AG50W-X8 (>400 mesh) e AG50W-X8 (200-400 mesh). A ativação da resina não influenciou os resultados relacionados com a retenção do ^{68}Ga e em relação à redução das impurezas.

6.5.1.5 - Estudo Comparativo de Resinas Catiônicas comercialmente disponíveis em relação a AG50W-X8 (>400 mesh)

A TAB. 13 mostra os resultados das resinas catiônicas estudadas em relação à atividade total de ^{68}Ga eluído (solução N_2) e à perda de atividade de ^{68}Ga nas outras fases do processo.

TABELA 13- Estudo das Resinas Catiônicas em Relação à porcentagem (%) de ^{68}Ga eluído (n=3)

Resina	Mesh	Carga	Solução N_1	Solução N_2	HCl 4 $molL^{-1}$ + H_2O*	Resina
AG50W-X2	100- 200	27 ± 2	27 ± 7	43 ± 5	2 ± 1	1 ± 1
AG50W-X4	100- 200	11 ± 4	4 ± 1	66 ± 9	14 ± 5	5 ± 2
AG50W-X4	200- 400	1 ± 0,4	4 ± 1	86 ± 3	8 ± 3	0,7 ± 0,2
AG50W-X8	200- 400	0,8 ± 0,3	1,0 ± 0,2	47 ± 7	42 ± 6	9 ± 3
AG50W-X8	>400	2 ± 0,4	4 ± 1	91 ± 1	3 ± 1	0,8 ± 0,3
AG50W-X12	100- 200	5 ± 2	1 ± 0,1	14 ± 3	34 ± 3	45 ± 4

* O HCl 4 $molL^{-1}$ para recondicionar a resina e água para lavá-la

A TAB. 12 mostra claramente que a atividade de ^{68}Ga recuperada é maior quando usada a resina AG50W-X8 (>400 mesh), porém uma outra resina que apresentou bons resultados foi a AG50W-X4 (200-400 mesh).

A resina AG50W-X8 (200-400 mesh) usada nos primeiros experimentos não apresentou resultados promissores para dar continuidade ao seu uso neste tipo de experimento.

Na TAB. 14 estão apresentados os resultados referentes à redução das impurezas químicas do processo, após o processo de purificação.

TABELA 14 - Redução das impurezas contidas no eluato de ^{68}Ga após o processo de purificação de diferentes resinas catiônicas (n=3)

			Redução das Impurezas (%)		
Resina	**Mesh**	**Fe**	**Ti**	**Zn**	**Ge**
AG50W-X2	100- 200	58 ± 29	80 ± 4	40 ± 11	72 ± 6
AG50W-X4	100- 200	60 ± 25	81 ± 3	65 ± 17	77 ± 7
AG50W-X4	200- 400	86 ± 10	79 ± 2	67 ± 12	82 ± 9
AG50W-X8	200- 400	65 ± 15	82 ± 2	45 ± 11	74 ± 5
AG50W-X8	>400	64 ± 24	83 ± 3	54 ± 22	88 ± 2
AG50W-X12	100- 200	53 ± 22	64 ± 32	21 ± 28	82 ± 4

As impurezas químicas que mais influenciam em processos de marcação de biomoléculas com o ^{68}Ga são o Fe e o Zn. Os melhores resultados encontrados foram obtidos com a purificação do ^{68}Ga com a resina AG50W-X4 (200-400 mesh), resultados superiores à resina AG50W-X8 (> 400mesh), ou seja, a quantidade de Fe e Zn foram reduzidas à 86 ± 10% e 67 ±12%, respectivamente com a resina AG50W-X4 (200-400 mesh) e 63 ± 23% para Fe e 54 ± 21% para Zn com a resina AG50W-X8 (>400 mesh). Outra vantagem é que esta resina é disponível comercialmente pela empresa Bio-Rad (EUA) e a coluna cromatográfica ao ser regenerada com HCl 4 molL^{-1}, pode ser reutilizada ao menos por 3 vezes, pois não apresentou diminuição gradativa em relação à recuperação do ^{68}Ga, bem como a purificação das principais impurezas estudadas, como mostra a TAB. 15.

TABELA 15 - Valores obtidos em relação à recuperação do ^{68}Ga e redução das impurezas químicas de cada processo de purificação do ^{68}Ga com a mesma resina catiônica AG50W-X4 (200-400 mesh)

		Redução das Principais Impurezas (%)			
No. de experimentos	**Recuperação do ^{68}Ga (%)**	**Fe**	**Ti**	**Zn**	**Ge**
1º	82	98	78	65	78
2º	87	78	78	57	75
3º	87	82	82	81	93
Média	86 ± 3	86 ± 10	79 ± 3	67 ± 12	82 ± 10

Apesar dos resultados de purificação serem promissores seguindo esta metodologia, a quantidade de Zn ainda permaneceu elevada no eluato final, bem como a quantidade de Ge (TAB. 16). Entretanto, estes experimentos foram realizados quando o gerador de ^{68}Ge-^{68}Ga completou 1 ano a partir da data de calibração, o que pode ter influenciado na quantidade de Ge encontrado no eluato final. O nível de Zn foi alto também nos reagentes (item 6.4), principalmente, no HCl (30%, suprapuro; Merck), usado em todas as etapas, incluindo na solução N_2 usada para eluir o ^{68}Ga. Por este motivo, houve uma grande variação nos resultados apresentados. Além disso, como estes experimentos foram realizados manualmente, a velocidade de eluição pode ter influenciado no resultado final de redução das impurezas, bem como influenciou na adsorção do ^{68}Ga na coluna cromatográfica.

TABELA 16 – Valores de massa total (em µg) de impurezas no eluato final de ^{68}Ga (5mL) após a purificação na resina catiônica AG50W-X4 (200-400 mesh)

	Quantidade das Impurezas (µg)			
No. de experimentos	**Fe**	**Ti**	**Zn**	**Ge**
1º	0,7	0,3	182	4
2º	0,7	0,3	121	5
3º	0,2	0,2	53	2

A quantidade de ^{68}Ge na amostra de ^{68}Ga purificado permaneceu na faixa de 10^{-3}% em todos os experimentos, dentro do limite especificado pelo fabricante (10^{-3}%), como mostra a TAB. 17:

TABELA 17- Quantidade de ^{68}Ge (%) no eluato de ^{68}Ga após a purificação na resina catiônica (n=3)

Resina	**Mesh**	**Quantidade de ^{68}Ge (%)**
AG50W-X2	100- 200	$(7 \pm 2) \times 10^{-3}$
AG50W-X4	100- 200	$(7 \pm 0,9) \times 10^{-3}$
AG50W-X4	200- 400	$(4 \pm 2) \times 10^{-3}$
AG50W-X8	200- 400	$(5,0 \pm 0,3) \times 10^{-3}$
AG50W-X8	>400	$(3 \pm 2) \times 10^{-3}$
AG50W-X12	100- 200	$(4,0 \pm 0,2) \times 10^{-3}$

6.5.1.5 – Estudo de Purificação do ^{68}Ga Usando as Menores Partículas das Resinas AG50W-X4 (200-400 mesh) e AG50W-X8 (200-400 mesh)

Na TAB. 18 estão descritos os resultados das menores partículas da resinas catiônicas estudadas em relação as atividade total de ^{68}Ga eluído (solução N_2) e a perda de atividade de ^{68}Ga nas outras fases descritas.

TABELA 18 - Estudo das Menores Partículas das Resinas Catiônicas em Relação à Atividade de ^{68}Ga eluído em %, n=3

Resina	Coleta da Carga	Solução N_1	Solução N_2	HCl 4 molL^{-1} + H_2O*	Resina
AG50W-X4	0	5 ± 2	91 ± 3	4 ± 1	0,6 ± 0,1
AG50W-X8	0,2 ± 0,3	0,8 ± 0,6	59 ± 7	32 ± 5	8 ± 3

* O HCl 4 molL^{-1} para recondicionar a resina e água para lavá-la

A TAB. 19 mostra os resultados em relação à redução das impurezas químicas e a TAB. 20 mostra a quantidade (em %) de ^{68}Ge no eluato de ^{68}Ga. A quantidade de ^{68}Ge permaneceu a mesma (10^{-3}%) no eluato.

TABELA 19 - Redução das impurezas químicas no eluato de ^{68}Ga após o processo de purificação realizado com as menores partículas de resinas catiônicas (n=3)

	Redução das Impurezas (%)			
Resina	**Fe**	**Ti**	**Zn**	**Ge**
AG50W-X4	82 ± 6	81 ± 6	83 ± 10	82 ± 15
AG50W-X8	74 ± 20	79 ± 4	77 ± 10	88 ± 7

TABELA 20 - Quantidade de ^{68}Ge (%) no eluato de ^{68}Ga (n=3)

Resina	**Quantidade de ^{68}Ge**
AG50W-X4	$(4 \pm 1) \times 10^{-3}$
AG50W-X8	$(3,0 \pm 0,6) \times 10^{-3}$

Os resultados apresentados pela coluna cromatográfica contendo as menores partículas da resina catiônica AG50W-X4 (200-400 mesh) são superiores em relação à recuperação do ^{68}Ga, porém, em relação à redução das impurezas químicas os valores entre as menores partículas das duas resinas se assemelham.

A TABs. 21 e 22 mostram a comparação entre os métodos de purificação das menores partículas da resinas catiônicas estudadas em relação aos resultados citados no item 6.5.1.3.

TABELA 21 - Comparação entre o processo de purificação do ^{68}Ga usando somente as menores partículas da resina catiônica AG50W-X8 (200-400) e as partículas de 200-400 mesh da mesma resina

		Redução das Principais Impurezas (%)			
Resina	**Recuperação do ^{68}Ga (%)**	**Fe**	**Ti**	**Zn**	**Ge**
AG50W-X8 (200-400)	47 ± 7	65 ± 15	82 ± 2	45 ± 11	74 ± 5
AG50W-X8	59 ± 7	74 ± 20	79 ± 4	77 ± 10	88 ± 7

TABELA 22 - Comparação entre o processo de purificação do ^{68}Ga usando somente as menores partículas da resina catiônica AG50W-X4 (200-400) e as partículas de 200-400 mesh da mesma resina

Resina	Recuperação do ^{68}Ga (%)	Redução das Principais Impurezas (%)			
		Fe	Ti	Zn	Ge
AG50W-X4 (200-400)	86 ± 3	86 ± 10	79 ± 3	67 ± 12	82 ± 10
AG50W-X4	91 ± 3	82 ± 6	81 ± 6	82 ± 10	82 ± 15

Em relação à redução da impureza principal química, o Zn, os resultados usando as menores partículas da resina catiônica AG50W-X8 (200-400) foram melhores. Nos estudos realizados com a resina catiônica AG50W-X4 (200-400), a vantagem em se usar as menores partículas também está relacionada à redução do Zn no eluato de ^{68}Ga. Considerando que o Zn, é a principal impureza encontrada em todos os experimentos, é preferível usar as menores partículas desta resina, bem como há um aumento da recuperação do ^{68}Ga purificado.

6.5.1.6- Purificação do ^{68}Ga em Resina Catiônica na presença de ^{65}Zn

A TAB. 23 mostra os resultados do processo de purificação realizado com a resina AG50W-X4 (200-400 mesh) com ^{68}Ga e ^{65}Zn:

TABELA 23 - Comportamento do ^{65}Zn na purificação do ^{68}Ga em resina catiônica AG50W-X4 (200-400 mesh)

Etapa	**% ^{68}Ga**	**% ^{65}Zn**
Coleta da Carga	9,5	36,0
Solução N_1	1,2	39,2
Solução N_2^*	52,5	6,5
1mL HCl 4 $molL^{-1}$+ 1mL de H_2O	36,8	18,3
Total	100,0	100,0

*Solução N_2 é a solução em que o ^{68}Ga é eluído

Os resultados da TAB. 23 mostram claramente que o ^{65}Zn não ficou retido na coluna cromatográfica contendo a resina AG50W-X4 (200-400 mesh) e o restante foi removido com a solução N1, totalizando 75,0% do ^{65}Zn removido nas fases preliminares à eluição do ^{68}Ga purificado, em que apenas 6,5% de ^{65}Zn é extraído. O comportamento do ^{65}Zn foi semelhante ao experimento realizado com a resina AG50W-X8 (200-400 mesh) como mostra a TAB. 24:

TABELA 24 - Comportamento do ^{65}Zn na purificação do ^{68}Ga em resina catiônica AG50W-X8 (200-400 mesh)

Etapa	**% ^{68}Ga**	**% ^{65}Zn**
Coleta da Carga	0,9	16,4
Solução N_1	0,7	49,2
Solução N_2^*	39,4	12,7
1ml HCl 4 $molL^{-1}$+ 1mL de H_2O	59,0	21,7
Total	100,0	100,0

*Solução N_2 é a solução em que o ^{68}Ga é eluído

6.5.2 – Purificação do $^{67/68}$Ga por Extração por Solventes

6.5.2.1- Extração por Solventes – Líquido-Líquido

No primeiro experimento de extração por solventes em meio líquido foi usado o ^{67}Ga em HCl 7 molL^{-1}. O resultado de recuperação do ^{67}Ga foi (72,5±0,1)% (n=3) em 30mL de água deionizada. Apesar de se obter um bom resultado, o volume final contendo ^{67}Ga é considerado grande para a marcação com biomoléculas. Além disso, este processo é longo e não é adequado para o tempo de meia vida do ^{68}Ga. Ao reduzir o volume final total para 4,0mL utilizando um vortex para melhor agitação da solução, a recuperação do ^{68}Ga foi de (97,7±1,3)% (n=3). Apesar deste processo apresentar bons resultados de rendimento de recuperação do $^{67/68}$Ga, a presença de contaminantes aumentou em ambos os casos. É um método com muitas dificuldades experimentais (volatidade do éter diisopropílico, dificuldade de verificar a linha da separação das fases) e pouco prático para automação e marcação de biomoléculas, sendo necessário um local adequado para manipular os reagentes voláteis.

6.5.2.2 - Extração por Solventes em Coluna Cromatográfica

A recuperação do ^{68}Ga na extração por solventes em coluna cromatográfica (10mm de diâmetro) foi de 83% em 3mL de água deionizada. O nível de contaminantes foi reduzido em 69% no primeiro procedimento. Um dia após, foi realizada outra purificação com a mesma coluna, o nível de impurezas foi reduzido para 67% e 59% nove dias após a primeira purificação, como mostra a FIG. 42. A recuperação do ^{68}Ga também decaiu para 81% e 79%, respectivamente. Esta redução é devida à evaporação do solvente (éter diisopropílico).

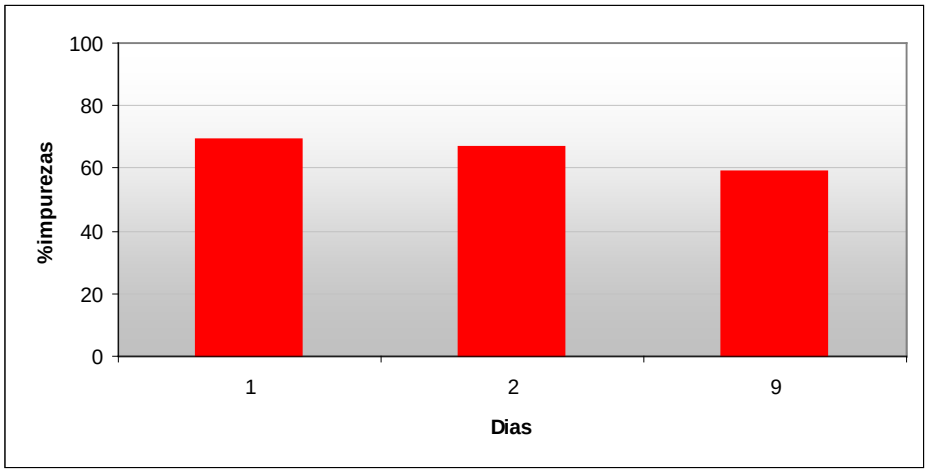

FIGURA 42 – Redução das impurezas presentes no eluato com os intervalos de eluição

O eluente foi alterado para HCl 0,05 molL^{-1}. A recuperação do ^{68}Ga foi de 71%, porém houve uma redução das impurezas totais de 72%. A presença do HCl no eluato aumenta a quantidade de impurezas totais, principalmente o Fe e o Zn.

6.5.2.2.1 - Efeito da Adição de Agentes Redutores para reduzir Fe^{3+} para Fe^{2+}

O suporte da coluna foi mudado para micropipeta plástica. Com esta alteração, o tempo total do processo foi reduzido para cinco minutos e o volume final contendo ^{68}Ga purificado foi reduzido para 1mL em todos os experimentos. Apesar de recuperar apenas 52% do ^{68}Ga, houve uma redução de 82% das impurezas. Outros experimentos foram realizados na mesma coluna, como citado no parágrafo anterior e o nível de impureza foi reduzido para 78% e 70%, respectivamente. Porém, a recuperação do ^{68}Ga foi maior (56%) em ambos os casos.

Foi adicionado o agente redutor $TiCl_3$ na solução inicial contendo ^{68}Ga antes do processo de purificação. O resultado de recuperação do ^{68}Ga aumentou para 72% e as impurezas totais foram reduzidas em 77%. Houve uma redução de 56% do Fe^{3+}. A

quantidade de Ti no eluato foi de 110µg, muito acima quando comparado com os outros métodos de purificação em que a quantidade de Ti não ultrapassa 1µg.

Nos experimentos em que foi adicionado o NaI 1%, a recuperação do ^{68}Ga foi de 58% e as impurezas totais foram reduzidas em 74%. Houve uma redução de 72% do Fe^{3+}. Sem a adição de um agente redutor, o nível de Fe^{3+} diminui para 70%, ou seja, 2% a menos quando comparado ao resultado obtido com a adição de NaI 1%, como mostra a TAB. 25.

TABELA 25- Influência da adição de agente redutor na purificação do ^{68}Ga por extração por solventes em coluna cromatográfica

	Sem Agente Redutor	**Adição de NaI 1%**	**Adição de $TiCl_3$**
% recuperação do ^{68}Ga	52%	58%	72%
% redução das impurezas totais	82%	74%	77%
% redução do Fe	70%	72%	56%

Os experimentos nesta mesma coluna foram repetidos, sem adição de um agente redutor. Porém houve uma grande variação nos resultados, intereferindo na reprodutibilidade referente à recuperação do ^{68}Ga e redução de impurezas. Provavelmente, isso se deve à variação da adsorção do éter diisopropílico na resina XAD 16. Em que nos primeiros experimentos foi usada a relação 1,4mL de éter diisopropílico para cada grama de XAD 16. Todavia, esta relação de massa começou a apresentar um excesso de solvente e teve que ser reduzida para 0,7mL de éter diisopropílico para cada grama de XAD 16 e pemaneceu em contato durante 48 horas à -20ºC. Os resultados de recuperação do ^{68}Ga foi (74 ± 2)% (n=2). Entretanto, os níveis de contaminantes do Fe e do Zn foram maiores que a quantidade inicial,

enquanto que os níveis de Ge e Ti permaneceram abaixo. Uma provável explicação é a grande quantidade de contaminantes presentes no HCl 7 $molL^{-1}$, em que a concentração de HCl é maior em relação ao HCl 0,1 $molL^{-1}$ usado para eluir o gerador de $^{68}Ge/^{68}Ga$.

6.5.2.2.2 – Purificação do ^{68}Ga por Extração por Solventes em Coluna Cromatográfica com ^{65}Zn

Este experimento foi realizado por extração por solventes em coluna cromatográfica de vidro contendo 240 mg de resina XAD 16 adsorvida com éter diisopropílico. A TAB. 26 mostra que 95,82% do ^{65}Zn não ficou retido na resina e saiu nas duas primeiras etapas, enquanto que 73,50% do ^{68}Ga foi eluído em 1mL de H_2O com apenas 0,34% de ^{65}Zn.

TABELA 26 - Comportamento do ^{65}Zn na purificação do ^{68}Ga por extração por solventes em coluna cromatográfica

Etapa	**% ^{68}Ga**	**% ^{65}Zn**
Coleta da Carga (HCl 7 $molL^{-1}$)	7,4	77,4
1mL de HCl 7 $molL^{-1}$	1,8	18,5
1mL de HCl 7 $molL^{-1}$	1,3	2,3
1mL de HCl 7 $molL^{-1}$	1,3	0,8
1mL de HCl 7 $molL^{-1}$	1,3	0,2
1mL de HCl 7 $molL^{-1}$	1,3	0,2
1mL de H_2O	73,5	0,3
1mL de H_2O	10,8	0,2
1mL de H_2O	1,3	0,1
Total	100,0	100,00

6.5.2.2.2.1 – Coeficiente de distribuição do ^{68}Ga e ^{65}Zn

As FIGs. 43 e 44 mostram a variação do coeficiente de distribuição (K_D) do Ga e Zn, respectivamente. Na extração em coluna XAD/éter diisopropílico o comportamento é bem distinto. Enquanto que para o ^{68}Ga quanto maior a concentração de HCl maior é o coeficiente de distribuição (K_D), o ^{65}Zn não foi significantemente adsorvido na resina em nenhuma concentração do HCl estudada, apresentando assim um K_D muito baixo em relação ao K_D do ^{68}Ga.

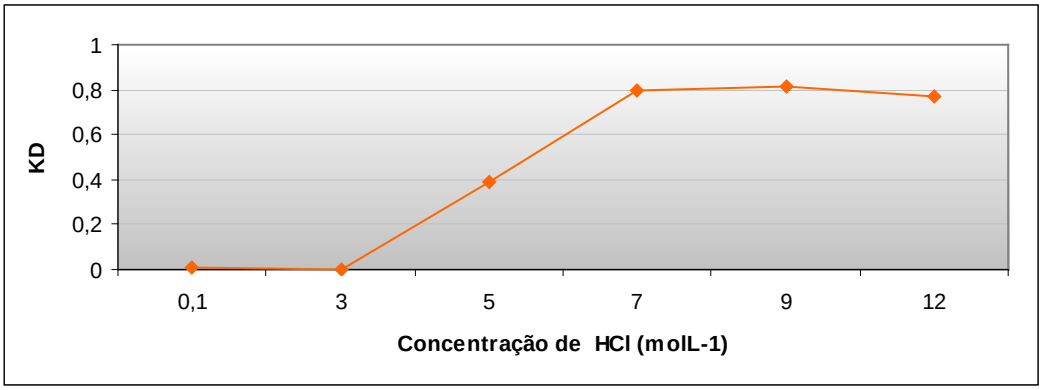

FIGURA 43 - Coeficiente de Distribuição do ^{68}Ga em éter diisopropílico adsorvido na resina XAD-16 em função da concentração de HCl

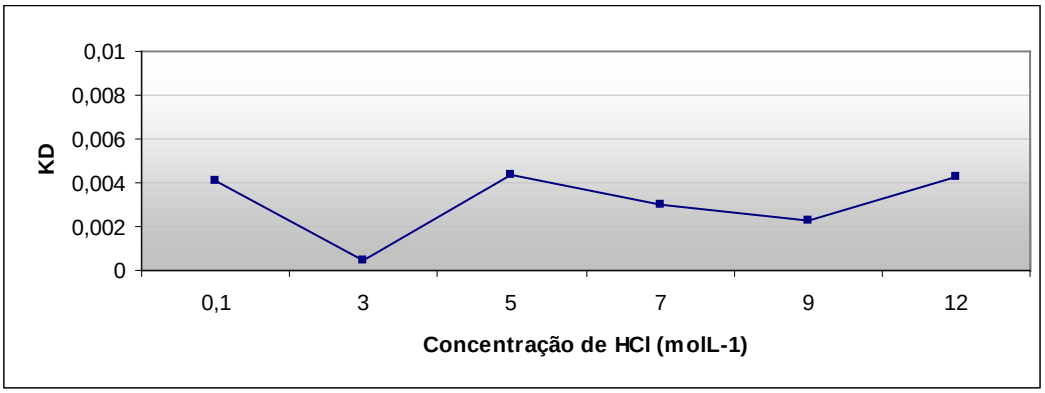

FIGURA 44 - Coeficiente de Distribuição do ^{65}Zn em éter diisopropílico adsorvido na resina XAD-16 em função da concentração de HCl

A recuperação do ^{68}Ga em HCl 7 $molL^{-1}$ é praticamente igual a recuperação em 9 $molL^{-1}$. Entretanto, a concentração de ácido é menor. Por isso, a partir deste estudo, foi confirmado o ajuste da concentração de HCl para 7 $molL^{-1}$ para realizar a purificação em XAD/éter diisopropílico.

Apesar da extração por solventes apresentar bons rendimentos de separação entre as espécies estudadas, a quantidade de impurezas, como o Zn aumenta devido à alta concentração de HCl (HCl 7 $molL^{-1}$) necessária para realizar a purificação neste meio. Além disso, são necessários testes para verificar a quantidade de éter diisopropílico na solução final.

6.5.3 - Purificação do ^{68}Ga por Resina Catiônica em Meio Básico

A FIG. 45 mostra o resultado típico de purificação do ^{68}Ga em resina catiônica. A maior parte do ^{68}Ga (78,7%) não ficou retida na resina, enquanto que o ^{65}Zn permaneceu na coluna, pois não foi eluído nem em meio básico e nem meio ácido.

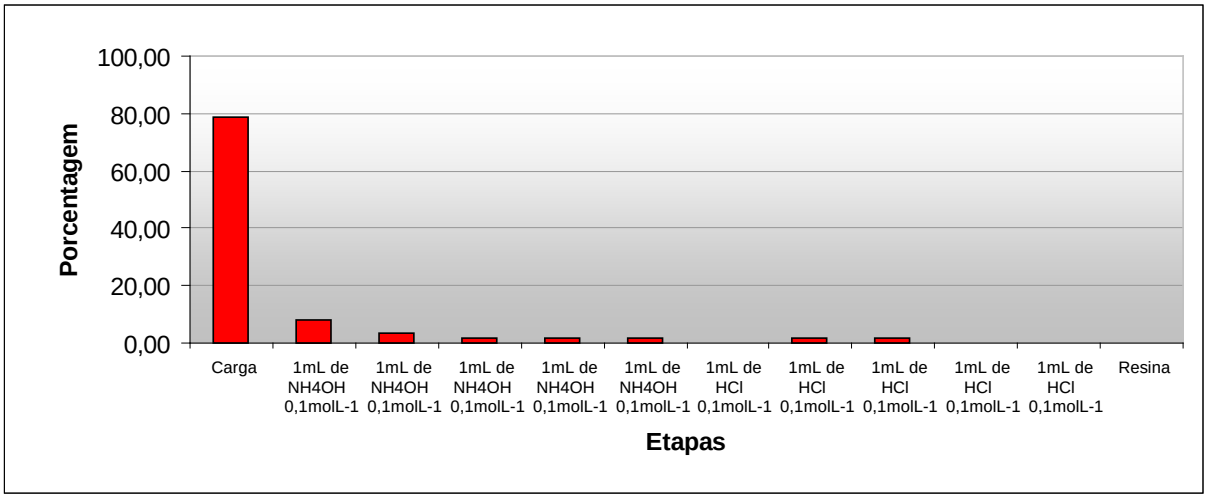

FIGURA 45 – Perfil eluição do ^{68}Ga e ^{65}Zn em resina catiônica em meio básico

Este mesmo experimento foi realizado somente com a ^{68}Ga e os volumes de NH_4OH 0,1 $molL^{-1}$ e HCl 0,1 $molL^{-1}$ foram reduzidos para 3mL. A TAB. 27 mostra os valores obtidos.

TABELA 27 – Recuperação do ^{68}Ga em coluna microcromatográfica com resina catiônica em meio básico (n=2)

	Recuperação do ^{68}Ga (%)		
Etapas	**1º**	**2º**	**Média**
Coleta da Carga	79,7	77,9	79 ± 1
1mL de NH_4OH 0,1 $molL^{-1}$	8,8	7,9	8 ± 1
1mL de NH_4OH 0,1 $molL^{-1}$	2,0	4,4	3 ± 1
1mL de NH_4OH 0,1 $molL^{-1}$	0,4	2,6	2 ± 2
1mL de HCl 0,1 $molL^{-1}$	1,4	1,8	2 ± 1
1mL de HCl 0,1 $molL^{-1}$	2,0	1,8	2 ± 1
1mL de HCl 0,1 $molL^{-1}$	1,3	0	1 ± 1
Coluna	3,4	3,5	3 ± 1

Além de apresentar um excelente recuperação do ^{68}Ga, a purificação realizada em resina catiônica em meio básico, apresentou ótimos resultados de redução das impurezas químicas (Fe, Ti, Zn e Ge) (TAB. 28), principalmente do Zn, a principal impureza encontrada neste trabalho.

TABELA 28- Redução das impurezas químicas em coluna microcromatográfica com resina catiônica em meio básico (n=3)

Experimento	Recuperação do ^{68}Ga (%)	Redução das Principais Impurezas (%)			
		Fe	Ti	Zn	Ge
1º	79,7	92,9	94,1	95,8	59,3
2º	77,9	68.5	92,6	99,5	68,5
Média	79 ± 1	81 ± 17	93 ± 1	98 ± 3	64 ± 7

A massa (µg) total de impurezas metálicas encontrada em 1mL de NH_4OH $molL^{-1}$, meio em que se encontra o ^{68}Ga, após o processo de purificação foi de 18µg no primeiro experimento e 9µg no segundo experimento

No procedimento sugerido elimina-se o uso de HCl 0,1 $molL^{-1}$, que poderia ser utilizado para retirar as impurezas da resina e permitir o reaproveitamento da mesma. A regeneração da resina apenas com 20 mL de NH_4OH 0,1 $molL^{-1}$ foi suficiente para reutilizar a resina mantendo os resultados iniciais.

6.5.4 - Comparação entre os métodos de purificação do ^{68}Ga

Os métodos de purificação do ^{68}Ga mais promissores foram: o método em que o ^{68}Ga é recuperado em meio de acetona/HCl (98/2)%, percolado em coluna cromatográfica (micropipeta) com menores partículas selecionadas da resina catiônica AG50W-X4 (200-400) e o método em que o ^{68}Ga também é percolado em resina catiônica e purificado e retomado em meio básico. O primeiro método é o usado em módulos automatizados de síntese de peptídeos marcados com ^{68}Ga. O segundo é o método inédito desenvolvido neste trabalho.

Ambos os métodos são práticos, rápidos e apresentam bons resultados de recuperação do ^{68}Ga e redução das impurezas químicas (Fe, Ti, Zn e Ge), como mostra a TAB. 29:

TABELA 29 – Comparação entre dois métodos de purificação do ^{68}Ga em relação à recuperação do ^{68}Ga e redução das impurezas químicas

		Redução das Principais Impurezas (%)			
Meio	**Recuperação do ^{68}Ga (%)**	**Fe**	**Ti**	**Zn**	**Ge**
Ácido/acetona	91 ± 3	82 ± 6	81 ± 6	82 ± 10	82 ± 15
Básico	79 ± 1	81 ± 17	93 ± 1	98 ± 3	64 ± 7

6.6- Marcação do DOTATOC com ^{68}Ga

O ^{68}Ga foi purificado em meio de acetona/HCl e o melhor resultado de rendimento da marcação foi de 26% em um sistema manual e a pureza radioquímica foi de 98% de DOTATOC marcado com ^{68}Ga. O rendimento de marcação está de acordo o resultado apresentado por Decristoforo *et al* (2007) (<35%) em um sistema semi-automático. Resultados apresentados na literatura em sistemas automáticos têm um rendimento superior a 95% (Zhernosekov *et al*, 2007). Os sitemas automatizados fazem com que o operador não manipule nenhum dos reagentes durante o processo, que acontece em sistema fechado, o que favorece a diminuição da dose de radiação para o colaborador e o risco de contaminação por pirogênios.

6.6.1 – Comparação da marcação do DOTATATO com ^{68}Ga purificado e não purificado

A TAB. 30 sumariza os resultados de marcação do DOTATATO com o ^{68}Ga obtido através de diferentes meios de purificação e comparado com o ^{68}Ga sem a purificação prévia.

TABELA 30 – Comparação dos resultados de pureza radioquímica da marcação do DOTATATO com ^{68}Ga em diferentes meios

Obtenção do ^{68}Ga	**Rendimento de Marcação (%)**
^{68}Ga sem purificação prévia	13,5
^{68}Ga purificado em coluna de extração (XAD-16)/éter diisopropílico	19,9
^{68}Ga purificado em resina catiônica em meio básico	34,3

Os resultados mostram que a purificação em resina catiônica em meio básico, proposta neste trabalho, mostrou rendimento de marcação superior em relação a marcação direta sem a purificação do ^{68}Ga. O método de purificação em coluna de extração mostrou bons resultados de purificação, mas não foram reprodutíveis. O maior problema é o preparo da resina e a sua conservação. Além disso, requer o uso de HCl concentrado no processo, situação não ideal a princípio.

7. CONCLUSÃO

Um método de purificação do ^{68}Ga inédito foi desenvolvido neste trabalho, que usa resina catiônica em meio de NH_4OH. Este método apresentou os melhores níveis de purificação entre os métodos estudados, compatível com o método comercial, que emprega também a resina catiônica em meio de acetona/HCl. A vantagem deste método é a separação do ^{68}Ga e o Zn (^{65}Zn), que foi a principal impureza encontrada neste trabalho. Ao contrário dos trabalhos publicados na literatura, em que o Fe é principal impureza encontrada.

O método proposto tem a vantagem de evitar o uso de um solvente orgânico, a acetona, e de HCl, que sempre pode aumentar o nível de impurezas metálicas.

Outro método inédito que mostrou resultados promissores foi o uso da extração em coluna, com éter diisopropílico adsorvido em resina XAD. O preparo e a conservação do sistema é o ponto mais importante a ser desenvolvido e que leve a resultados reprodutivos.

A purificação do ^{68}Ga realizada em resina catiônica em meio de acetona/HCl, baseada no trabalho de Zhernosekov (2007). Entretanto a resina que utilizada neste trabalho não é comercialmente disponível. Dentre diversas resinas catiônicas estudadas, a AG50W-X8 (200-400 mesh) apresentou resultados comparáveis a resina usada no trabalho original em relação à recuperação do ^{68}Ga e à redução das impurezas químicas.

REFERÊNCIAS

ABRÃO, A. ***Operações de Troca Iônica***. Instituto de Energia Atômica. São Paulo, p. 72, 1972.

AIME, S.; BOTTA, M.; FASANO, M.; TERRENO, E. Prototropic and Water-Exchange Processes in Aqueous Solutions of Gd(III) Chelates. ***Chem. Soc. Rev.***, v. 27, p.19-29, 1998.

ALAZRAKI, N.P; SHUMATE, M.J.; KOOBY, D.A. ***A Clinician's Guide to Nuclear Oncology****:* Practical Molecular Imaging and Radionuclide Therapies. Sociedade de Medicina Nuclear. Estados Unidos. Pag. 52-58, 2007.

ALDEGHERI, E.B. ***Avaliação in vivo e in vitro do DOTA-Lanreotideo radiomarcado com Gálio-67.*** 2005. Tese (Doutorado) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo.

ANTUNES, P.; GINJ, M.; WALTER, M.A.; *et al*. Influence of different spacers on the biological profile of a DOTA- somatostin analogue. ***Bioconjug. Chem.***, v. 18, p. 84-92, 2007.

ARINO, H.; SKRABA, W.J.; KRAMER, H.H. A new ^{68}Ge-^{68}Ga radioisotope generator system. ***Int. Appl. Radiat. Isot.***, v. 29, p. 117-120, 1978.

ASTI, M.; DE PIETRI, G.; FRATERNALI, A.; GRASSI, E.; SGHEDONI, R.; FIORONI, F.; ROESCH, F.; VERSARI, A.; SALVO, D. Validation of ^{68}Ge-^{68}Ga generator processing by

chemical purification for routine clinical application of ^{68}Ga – DOTATOC. ***Nucl. Med. Biol.***, v. 35, p. 721-724, 2008.

BANDOLI, G.; DOLMELLA, A.; TISATO, F.; PORCHIA, M.; REFOSCO, F. Mononuclear six-coordinated Ga(III) complexes: A comprehensive survey. ***Coord. Chem. Rev.***, v. 253, p. 56-77, 2009.

BAUWENS, M.; CHEKOL, R.; VANBILLOEN, H.; *et al*. Optimal buffer choice of the radiosynthesis of (68)Ga-DOTATOC for clinical application. ***Nucl. Med. Commun.***, v. 31, p. 753-758, 2010.

BAO, B.; SONG, M.S. A new ^{68}Ge-^{68}Ga generator based on CeO_2. ***Radioanal. Nucl. Chem.***, v. 213, p. 233-238, 1996.

BAUM, R.P.; ROESCH, F. 1st world congress on Ga-68 and peptide receptor radionuclide therapy (PRRNT), June 23-26, 2011, Zentralklinik Bad Berka, Germany. ***World J. Nucl. Med.***, v. 10, p. 1, 2011.

BOSWELL, C.A.; REGINO, C.A.S.; BAIDOO, K.E.; WONG, K.J.; BUMB, A.; XU, H.; MILENIC, D.E.; KELLEY, J.A.; LAI, C.C.; BRECHBIEL, M.W. Synthesis of a cross-brigde cyclam derivative for peptide conjugation and Cu-64 radiolabeling. ***Bioconjugate Chem.***, v. 19, p. 1476-1484, 2008.

BREEMAN, W.A.; de BLOIS, E.; CHAN, H.S.; KONIJNENBERG, M.; KWEKKEBOOM, D.J.; KRENNING, E.P. 68Ga- labeled DOTA – peptides and 68Ga- labeled radiopharmaceuticals for positron emission tomography: current status of research,

clinical applications, and future perspectives. ***Sem. Nucl. Med.***, v. 41, p. 314-321, 2011.

BREEMAN, W.A.; De JONG, M.; VISSER, T.J, *et al*. Optimising conditions for radiolabeling of DOTA-peptides with ^{90}Y, ^{111}In and ^{177}Lu at high specific activities. ***Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging***, v. 30, p. 917-920, 2003.

BREEMAN, W.A.; De JONG, M.; de BLOIS, E., *et al*. Radiolabeling DOTA-peptides with ^{68}Ga. ***Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging***, v. 32, p. 478-485, 2005.

BROOKS, D.J.; BEANEY, R.P.; LAMMERTSMA, A.A, *et al*. Quantitative measurement of blood brain barrier permeability using ribidium-82 and positron emission tomography. ***J. Cereb. Blood Flow Metab.***, v. 4, p. 535-545, 1984.

BROWN, L.C. Chemical processing of cyclotron produced ^{67}Ga. ***Int. J. Appl. Radiat. Isot.***, v. 22, p. 710-713, 1971.

BROWN, L.C.; CALLAHAN, A.P.;SKIDMORE, M.R.;,WILSON, T.B. High-Yield Zinc-68 Cyclotron Targets for Carrier-Free Gallium-67 Production ***Int. J. Appl. Radiat. Isot.***, v. 24, p. 651-655, 1973.

BRUCER, M.; ANDREWS, G.A.; BRUNER, H.D. A study of Gallium-72. ***37th Annual Meeting of the Radiological Society of North America***, 1951.

BRUCER, M.; ANDREWS, G.A.; BRUNER, H.D.; ***Radiology***, v. 61, p.534, 1953

BUCHANAN, W.S; SZABO, Z.; WAGNER, H.R.; BUCHANAN, J.W. ***Principles of Nuclear Medicine***. 2.ed. Filadélfia. Pág.1022-1026, 1995.

CHAKRAVARTY, R.; SHUKLA, R.; RAM, R.; VENKATESH, M.; ASHUTOSH, D.; TYAGY, A.K. Nanoceria-PAN Composite-Based Advanced Sorbent Material: A Major Step Forward in the Field of Clinical-Grade $^{68}Ge/^{68}Ga$ Generator. ***Appl. Mat. Interfaces***, v. 2, p. 2069-2075, 2010

CHINOL, M.; OBENAUS, E.R.; URBANO,N.; PAPI, S. The labeling of Peptides with Positron-Emitting Radionuclides: The importance of PET in Cancer Diagnosis. ***Radionuclide Peptide Cancer Therapy***. In: CHINOL, M.; PAGANELLI, G. Italy.: Informa HealthCare, p. 87-88, 2006.

CLARKE, E.T.; MARTELL, A.E. Stabilities of the Fe(III), Ga(III) e In (III) chelates of N, N', N"- triazacyclononanetriacetic acid. ***Inorg. Chim. Acta,*** v. 181, p. 273-280, 1991.

CLARKE, E.T.; MARTELL, A.E. Stabilities of trivalent metal-ion complexes of the tetraacetate derivatives of 12-membered, 13-membered and 14-membered tetraazamacrocycles. ***Inorg. Chim. Acta***, v. 190, p. 37-46, 1991.

COLLERY, P.; KEPPLER, C.; MADOULET, B.; DESOIZE, B. ***Crit Rev Oncol Hematol***, v. 42, p. 283, 2002.

COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. ***Fundamentos de Cromatografia***. Unicamp, 2006. Cap. 5.

COLOMBETTI, L.G.; GOODWIN, D.A. Chemistry of Ga-68 EDTA complex. ***J. Nucl.***

Med., v.10, p.396, 1969.

COLTURATO, M.T.; DIAS, L.A.P.; PUJATTI, P.B.; FUKUMORI, N.; MATSUDA, M.N.M.; MENGATTI, J.; ARAÚJO, E.B. Development the new radiopharmaceutical ^{68}Ga-DOTATATE in IPEN-CNEN/SP. Poster. In ***XXIII Congreso de ALASBIMN***, Porto de Galinhas – Brasil, 2011.

COOPER, M.S.; SABBAH, A.; MATHER, S.J. Conjugation of chelating agents to proteins and radiolabeling with trivalent metalic isotopes. ***Nature Protocols***, v. 1, p. 314-317, 2006.

CYCLOTRON Co. Ldt. Disponível em <http://www.cyclotron-company.com>. Acesso em: 10 out. 2011

Cyclotron Targets for Carrier-Free Gallium-67 Production ***Int. J. Appl. Radiat. Isot.***, v. 24, p. 651-655, 1973.

DESCRISTOFORO, C.; KNOPP, R.; von GUGGENBERG, E.; RUPPRICH, M.; DREGER, T.; HESS, A.; VIRGOLINI, I.; HAUBNER, R. A fully automated synthesis for the preparation of ^{68}Ga-labelled peptides. ***Nucl. Med. Comm.***, v. 28, p. 870-875, 2007.

De HERDER, W.W.; KWEKKEBOOM, D.J.; VALKEMA, R.; FEELDERS, R.A.; van AKEN, M.O.; LAMBERTS, S.W.; *et al*. Neuroendocrine tumours and somatostatin imaging techniques. ***J. Endocrinol. Invest.***; v. 28, p. 132-136, 2005.

ECKERT AND ZIEGLER. Disponível em <http://www.ezag.com>. Acesso em: 10 out. 2011

EDER, M.; KRIVOSHEIN, A.V.; BACKER, M.; BACKER, J.M.; HABERKORN, U.; EISENHUT, M. ScVEGF-PEG-HBED-CC e scVEGF-PEG-NOTA conjugates: comparison of easy-to-label recombinant proteins for ^{68}Ga PET imaging of VEGF receptors in angiogenic vasculature. ***Nucl. Med. Biol.***, v. 37, p. 405-412, 2010.

EDER, M.; WANGLER, B.; KNACKMUSS, S.; LEGALL, F.; LITTLE, M.;HABERKORN, U.; MIER, W.; EISENHUT, M. Tetrafluorophenolato of HBED-CC: a versatile conjugation agent for Ga-68-labeled small recombinant antibodies. ***Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging***, v. 35, p. 1878-1886, 2008.

EINSWIENER, K.P.; PRATA, M.I.; BUSCHMANN, I.; ZHANG, H.W.; SANTOS, A.C.; WENGER, S.; REUBI, J.C.; MAECKE, H.R. NODAGATOC, a new chelator-coupled somatostatin analogue labeled with $^{67/68}$Ga e ^{111}In for SPECT, PET and targeted therapeutic applications of somatostatin receptor (hsst2) expressing tumors. ***Bioconjug. Chem.***, v. 13, p. 530-541, 2002

FANI, M.; ANDRE, J.P; MAECKE, H. 68Ga-PET: a powerful generator-based alternative to cyclotron-based PET radiopharmaceuticals. ***Contr. Med. Mol. Imaging***, v.3, p. 53-62, 2008.

FERREIRA, F. A. ***Estudos da modificação da resina não-iônica Amberlite XAD-7 com monoetanolamina (MEA) para retenção de espécies de S(IV)***. 2007. Dissertação (Mestrado). Instituto de Química da Universidade de São Paulo, São Paulo.

FERREIRA, C.L.; LAMSA, E.; WOODS, M.; DUAN, Y.; FERNANDO, P.; BENSIMON, C.; KORDOS, M.; GUENTHER, K.; JUREK, P.; KIEFER, G.E. Evaluation of binfunctional chelates for the development of gallium-based radiopharmaceuticals. ***Bioconjugate Chem.***, v. 21, p. 531-536, 2010.

FISCHMAN, A.J.; BABICH, J.W.; STRAUSS, H.W. A ticket to ride: peptide radipharmaceuticals. ***J. Nucl. Med.***, v. 34, p. 2253-2263, 1993.

GABRIEL, M.; DECRISTOFORO, C.; DONNEMILLER, E.; ULMER, H.; RYCHLINKY, C.W.R.; MATHER, S.J.; MONCAYO, R. An intrapatient comparison of ^{99m}Tc-EDDA/HYNIC-TOC with ^{111}In-DTPA-octreotide for diagnosis of somatostin receptor-expressing tumors. ***J.Nucl. Med.***, v. 44, p. 708-716, 2003.

FORRER F.; UUSIJÄRVI, C.; WALDHERR, M.; CREMONESI, M.; BERNHARDT, P.; MUELLER-BRAND, J.; MAECKE, H.R. A comparison of ^{111}In – DOTATOC and ^{111}In – DOTATATE: biodistribution and dosimetry in the same patients with metastatic neuroendocrine tumours. ***Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging***, v. 31, p. 1257-1262, 2004.

GABRIEL, M.; DECRISTOFORO, C.; Kendler, D.; et al. ^{68}Ga-DOTA-Tyr^3-Octreotide PET in neuroendocrine tumors: comparison with somatostatin receptor scintilography and CT. ***J. Nucl. Med.***, v. 48, p. 508-518, 2007.

GREEN, A.M.; WELCH, M.J. Gallium Radiopharmaceutical Chemistry. ***Nucl. Med. Biol.***, v. 16, p. 435-448, 1989.

GREENE, M.W.; TUCKER,W.D. An improved gallium-68 cow. ***Int. J. Appl. Radiat. Isot.***, v. 12, p. 62-63, 1961

GROZINSKY-GLASBERG, S.; GROSSMAN, A.B.; KORBONITS, M. The role of somatostatin analogues in the treatment of neuroendocrine tumours. ***Mol. Cell. Endocrinol.***, v. 286, p. 238-250, 2008.

HAYES, R.L. In: ANDREWS, G.A.; KNISELEY, R.M.; WAGNER, H.N. ***Radioisotopes of gallium***. Radioactive Pharmaceuticals USAEC CONF-651111. Oak Ridge: U.S. Atomic Energy Comission; p. 603-618, 1966.

HAYES, R.L.; CARLTON, J.E.; BYRD, P.L.; Bone Scanning with gallium-68: a carrier effect. ***J. Nucl. Med.***, v.6, p.605-610, 1965.

HEPPELER, A.; FROIDEVAUX, S.; MÄCKE, H.R.; JERMANN, E.; BÉHÉ, M.; POWELL, P.; HENNIG, M. Radiometal-labelled macrocyclic chelator-derivatised somatostatin analogue with superb tumor-targeting properties and potential for receptor-mediated internal radiotherapy. ***Chem. Eur. J.***; v. 5, p. 1974-1981, 1999.

HOFMANN, M.; MAECKE, H.; BORNER, A.R.; WECKESSER, E.; SCHOFFSKI, P.; OEL, M.L., SCHUMAKER, J.; HENZE, M.; HEPPELER, A.; MEYER, G.J.; KNAPP, W.H. Biokinetics and imaging with the somatostatin receptor PET radioligand ^{68}Ga-DOTATOC: preliminar data. ***Eur. J. Nucl. Med***. 28: 1751 – 1757, 2001.

IDB HOLLAND. Disponível em <http://www.idb-holland.com>. Acesso em: 10 out. 2011

ITG ISOTOPE TECHNOLOGIES GARCHING. Disponível em <http://www.itg-garching.de>. Acesso em: 10 out. 2011

KAINTHAN, R.K.; BROOKS, D.E. In vivo biological evaluation of high molecular weight hyperbranched polyglycerols. ***Biomaterials***, v. 28, p. 4779-4787, 2007.

KAINTHAN, R.K.; HESTER, S.R.; LEVIN, E.; DEVINE, D.V.; BROOKS, D.E. In vitro biological evaluation of high molecular weight hyperbranched polyglycerols ***Biomaterials***, v. 28, p. 4581-4590, 2007.

KELLER, C. ***Radioquímica***. 1.ed. Recife, PE: Ed. Universitária Universidade Federal de Pernambuco, 1981. cap. 4, Medidas das radiações nucleares. p. 113-141.

KOPECKÝ, P.; MUDROVÁ, B. ^{68}Ge-^{68}Ga generator for the production of ^{68}Ga in an ionic form. ***Int. Appl. Radiat. Isot.***, v. 25, p. 263-268, 1974.

KOPECKÝ, P.; MUDROVÁ, B., SVOBODA, K. The study of conditions for the preparation and utilization of ^{68}Ge-^{68}Ga generator. ***Int. Appl. Radiat. Isot.***, v. 24, p. 73-80, 1973.

KOUKOURAKI, S.; STRAUSS, L.G.; GEORGOULIAS, V.; EISENHUT, M.; MAECKE, H.R.; HABERKORN, U.; *et al*. Comparison of the pharmacokinetics of ^{68}Ga-DOTATOC and ^{18}F-FDG in patients with metastatic neuroendocrine tumours (NET) scheduled for ^{90}Y-DOTATOC therapy. ***Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging***, v. 33, p. 460-466, 2006.

LAMMERTSMA, A.A.; BROOKS, D.J.; FRACKOWIAK, R.S.J.; HEATHER, J.D.; JONES, T. A method to quantitate the fractional extraction rubidium-82 across the blood brain barrier using positron emission tomography. ***J. Cereb. Blood Flow Metab.***, v. 4, p. 523-534, 1984.

LEDERER, C.M.; HOLLANDER,J.M.; PERLMAN,L. ***Table of isotopes***. New York; Willey; 1967: 6ª ed.

LEVADITI, C.; BARDER, J.; TCHAKIRIAN, A.; VAISMAN. ***Comp. Rent. Acad. Ser. D*** 192, p. 1142, 1931.

LEUNG, K. ^{68}Ga-DOTA synthetic Her 2 specific affibody. Molecular Imaging and Contrast Agent Database (MICAD). ***National Cancer for Biotechnology Information***, 2010.

LIU, S. The role of coordination chemistry in the development of target-specific radiopharmaceuticals. ***Chem. Soc. Rev.***, v. 33, p. 445-461, 2004.

LIU, S. The role of coordination chemistry in the development of target-specific radiopharmaceuticals. ***Chem. Soc. Rev.***, v. 33, p. 445-461, 2004.

LOC'H, C.; MAZIERE, B.; COMAR, D. A new generator for ionic gallium-68. ***J. Nucl. Med.***, v. 21, p. 171-173, 1980.

LOW, P.S.; HENNE, W.A.; DOORNEWEERD, D.D. Discovery and development of folic acid-based receptor targeting for imaging and therapy of cancer and inflammatory. ***Acc. Chem. Res.***, v. 41, p. 120-9, 2008.

MANTOURA, R.F. E RILEY, J.P. The analytical concentration of humic substances from natural waters. ***Anl. Chim. Acta***, v. 76, p. 97-106, 1975.

MELERO, L.T.U.H. ***Preparação e Padronização de Metodologia de Marcação in vitro e Estudo de Biodistribuição do Octreotídeo – [Tyr^3] – HYNIC/EDDA/Tricina – [^{99m}Tc].*** 2008. Tese (Mestrado) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo.

MIHAYLOV, I.; DISTIN, P.A. Gallium solvent extraction in hydrometallurgy: an overview. ***Hydrometallurgy***, v. 28, p. 13-27, 1992.

MODLIN, I.M.; KIDD, M.; LATICH, I.; ZIKUSOKA, M.N.; SHAPIRO, M.D. Current status of gastrointestinal carcinoids. ***Gastroenterology***, v. 128, p. 1717-1751, 2005.

MÜLLER, C.; MINDT, T.L.; de JONG, M.; SCHIBLI, R. Evaluation of a novel radiofolate in tumor-bearing mice: promising prospects for folate-based radionuclide therapy. Eur. ***J. Nucl. Med. Mol. Imaging***, v. 36, p. 938-946, 2009.

MÜLLER, C.; VLAHOV, I.R.; SANTHAPURAM, H.K.R.; LEAMON, C.P.; SCHIBLI, R. Tumor Targeting using ^{67}Ga – DOTA-BZ-folate - investigations of methods to improve the tissue distribution of radiofolates. ***Nucl. Med. Biol.***, v. 38, p. 715-723, 2011.

NAKAYAMA, M.; HARATAKE, M.; ONO, M.; KOISO, T.; HARADA, K.; NAKAYAMA, H.; YAHARA, S.; OHMOMO, Y.; ARNO, Y. A new generator ^{68}Ge-^{68}Ga system using an organic polymer containing N-methylglucamine groups as adsorbent for ^{68}Ge. ***Appl. Radiat. Isot.***, v. 58, p. 9-14, 2003.

NACHTRIEB, N.H. e FRYXELL, R.E. The extraction of gallium chloride by isopropyl ether. ***J. Am. Chem. Soc.***, v. 71, p.4035-4039, 1949.

NASCIMENTO, V.F. ***Técnicas analíticas nucleares na pesquisa agropecuária***: fluorescência de raios X e ativação neutrônica. Apostila publicada pelo Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo (CENA-USP), 1993.

NEIRINCKX, R.D.; DAVIS, M.A. Potential column chromatography for ionic ^{68}Ga. II: Organic ion exchangers as chromatography supports. ***J. Nucl. Med.***, v. 21, p. 81-83, 1980.

NEVES, M.; LAMBRECHT, R.M. Radionuclide production for therapy radiopharmaceuticals. ***Appl. Radiat. Isot.***, v. 57, p. 657-664, 2002.

NUNN, A.D. Molecular imaging and personalized medicine: an uncertain future. ***Cancer Biother. Radiopharm.***, v. 22, p. 722-739, 2007.

OBERG, K.; KVOLS, L.; CAPLIN, M.; DELLE FAVE, G.; de HERDER, W.; RINDI, G, *et al*. Consensus report on the use of somatostatin analogs for the management of neuroendocrine tumors of the gastroenteropancreatic system. ***Ann. Oncol.***, v. 15, p. 966-973, 2004.

OLIVEIRA, A.D.; CLAIN, A.F. Estudo comparativo da espectrometria de emissão atômica com fonte de plasma indutivamente acoplado com a espectrometria de emissão atômica com fonte de centelha para analise quantitativa de aço. ***Rev. TECCEN,*** vol. 3, p.44 -58, 2010.

OLAFSEN, T.; BETTING, D.; KENANOVA, V.E.; SALAZAR, F.B.; CLARKE, P. SAID, J.; RAUBITSCHEK, A.A.; TIMMERMMAN, J.M.; WU, A.M. Recombinant anti-CD20 antibody fragments for small-animal PET imaging of B-cell lymphomas. ***J. Nucl. Med.***; v.50, p. 1500-1508, 2009.

OLAFSEN, T.; WU, A.M. Antibody vectors for imaging. ***Sem. Nucl. Med.***, v. 40, p.167-181, 2010.

OLSEN, J.O.; POZDERAC, R.V.; HINKLE, G.; HILL, T. O'DORISIO, T.M.; SCHIRMER, W.J.; ELLISON, E.C.; O'DORISIO, M.S. Somatostatin receptor imaging of neuroendocrine tumours with Indium-111 pentetreotide (OctreoScan®). ***Sem. Nucl. Med.***, v.25, p.251-261, 1995

PAUWELS, E.K.J.; McCREADY, V.R.; STOOT, J.H.M.B.; van DEURZEN, D.F.P. ***Eur. J. Nucl. Med.***, v. 25, p.277, 1998.

PETTINATO, C.; SARNELLI, A.; DI DOMMA, M.; CIVOLLANI, S.; NANNI, C.; MONTINI, G.; *et al*. ^{68}Ga-DOTANOC: biodistribution and dosimetry in patients affected by neuroendocrine tumors. ***Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging***, v. 35, p. 72-79, 2008.

POMPER, M.G.; GELOVANI, J.G. ***Molecular Imaging in Oncology***. Informa Healthcare. Nova York, p. xix, 2008.

POURBAIX, M.; ZHANG, H.; POURBAIX, A. Presentation of an atlas of chemical and electrochemical equilibria in the presence of a gaseous phase. ***High Temp. Corros. Protect Mater 4***, p. 143-148, 1997.

POZZILLI, C.; BERNARDI, S.; MANSI, L.; PICOZZI, P.; IANOTTI, F.; ALFANO, B.; BOZZAO, L.; LENZI, G.L.; SALVATORE, M.; CONFORTI, P.; FIESCHI, C. Quantitative assessment of blood-brain-barrier permeability in multiple sclerosis using ^{68}Ga-EDTA and positron emission tomography. ***J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry***, v. 51, p. 1058-1062, 1988.

PRASAD, V.; BAUM, R.P. Biodistribution of the ^{68}Ga labeled somatostin analogue DOTANOC in patients with neuroendocrine tumors: characterization of uptake in

normal organs and tumor lesions. ***Q. J. Nucl. Med. Mol. Imaging***, v. 54, p. 61-67, 2007.

RAINO, H.; SKRABA, W.J.; KRAMER H. H. A new Ge-68/Ga-68 radioisotope generator system. ***Int. J. Appl. Radiat. Isot.***, v. 29, p. 117-120, 1978.

REUBI, J.C. Peptide receptors as molecular targets for cancer diagnosis and therapy. ***Endocr. Rev.***, v.24, p.389-427, 2008.

RIEMAN III, W.; WALTON, H.F. **Ion exchange in analytical chemistry**; New York, Pergamon Press. 1970.

ROESCH, F.; FILOSOFOV, D.V. Production, Radiochemical Processing and Quality Evaluation of ^{68}Ge. IAEA. 2008. Disponível em: < http://www-pub.iaea.org/MTCD/publications/PDF/Pub1436_web.pdf>. Acesso em 26 Fev 2012.

ROESCH, F.; RISS, P.J. The renaissance of the ^{68}Ge/^{68}Ga radionuclide generator initiates new developments in ^{68}Ga radiopharmaceutical chemistry. ***Curr. Top. Med. Chem***., v. 10, p. 1633-1668, 2010

ROSENFELD, G. Studies of the metabolism of germanium. ***Arch. Biochem. Biophys.***, v. 48, p. 84-94, 1954.

ROSSOUW, D.D.; BREEMAN, W.A. Scaled-up radiolabelling of DOTATATE with ^{68}Ga eluted from a SnO_2-based ^{68}Ge/^{68}Ga generator. ***Appl. Radiat. Isot.***, v. 70, p. 171-175, 2012.

SAATCHI, K.; GELDER, N.; GERSHKOVICH, P.; SIVAK, O.; WASAN, K.M.; KAINTHAN, R.K.; BROOKS, D.E.; HÄFELI, U.O. Long-circulating non-toxic blood pool imaging agent based on hyperbranched polyglycerols. ***Int. J. Pharm.***, v. 422, p. 418-427, 2012.

SANTOS, M.M.; ***Sistemas automatizados empregando resina de troca ionica para determinação dos íons Amônio, Cloreto e Sulfato em águas naturais***. 1991. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, São Paulo.

SAPIENZA, M.T.; BUCHPIGUEL, C.A.; HIRONAKA, F.H. ***Medicina Nuclear em Oncologia***. Atheneu, São Paulo. Pag. 43-55 2008.

SCHEIDHAUER, K.; WOLF, I.; BAUMGARTI, H.J.; von SCHILLING, C.; SCHMIDT, B.; REIDEL, G.; PESCHEL, C.; SCHWAIGER, M. Biodistribution and kinetics of ^{131}I-labelled anti-CD20 MAB IDEC-C2B8 (Rituximab) in relapsed non-Hodgkin's lymphoma. ***Eur. J. Nucl. Med.***; v. 29, p. 1276-1282, 2002.

SCHUHMACHER, J.; MAIER-BORST, W. A new ^{68}Ge-^{68}Ga radioisotope generator system for production of ^{68}Ga in dilute HCl. ***Int. Appl. Radiat. Isot.***,v. 32, p. 31-36, 1981.

SEGA, E.I.; LOW, P.S. Tumor detecting using folate receptor-target imaging agents. ***Cancer Metastasis Rev***., v. 27, p. 655-664, 2008.

SHEALY, C.N.; ARROW, S.; BROWNELL, G.L. Gallium-68 as scanning agent for intracranial lesions. ***J. Nucl. Med.***, v.5, p.161-167, 1964.

SHERRY, A.D.; BROWN, R.D.; GERALDES, C.F.G.; KOENIG, S.H.; KUAN, K.T.; SPILLER, M. Synthesis and characterization of the gadolinium (3+) complex of DOTA-

Propylamide a model DOTA-Protein conjugate. ***Inorg. Chem.***, v. 28, p. 620-622, 1989.

SKOOG, D.A. ***Principles of Instrumental Analysis***. 3a. ed. Saunchers College Publishing,EUA, 1985.

SKOOG, D.A. ***Fundamentals of Analytical Chemistry***. 8a. ed., Thomson. Canada, 2004.

SUZUKI, K.N. ***Estudos de Técnicas de Concentração da Atividade de 99mTc eluído de Geradores de ^{99}Mo/^{99m}Tc Tipo Gel.*** 2009. Tese (Doutorado) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - Universidade de São Paulo, São Paulo.

SWIFT, E.H. A new method for the separation of gallium from other elements. ***J. Am. Chem. Soc.***, v. 46, p. 2375-2381, 1924.

TANAKA, K.; FUKASE, K. PET (Positron Emission Tomography) imaging of biomolecules using metal-DOTA complexes: a new collaborative challenge by chemists, biologists, and physicians for future diagnostics and exploration of in vivo dynamics. ***Org. Biomol. Chem.***, v. 6, p.815-828, 2008.

TESTANERA, G.; van den BROEK. ***Principles and Practice of PET/CT***: A Technologist's Guide – part 2. European Association of Nuclear Medicine - Siemens. Viena, 2011.

UGUR, O.; PARESH, J.K.; FINN, R.D.; ZANZONICO, P.; RUAN, S.; GUENTHER, I.; MAECKE, H.R.; LARSON, S.T. ^{66}Ga labeled somatostin analogue DOTA-DPhe1-Tyr3-

octreotide as a potential agent for positron emission tomography imaging and receptor mediated internal radiotherapy of somatostin receptor positive tumors. ***Nucl. Med. Biol.***, v. 29, p. 147-157, 2002.

VALLABHAJOSULA, S. ***Molecular Imaging:*** Radiopharmaceuticals for PET and SPECT. Nova York. Pag. 1-9, 2009.

VELIKYAN, I. ***Synthesis, characterization and application of ^{68}Ga-labelled macromolecules.*** 2005. Tese (Doutorado) – Uppsala University, Suécia.

VELIKYAN, I.; MAECKE, H.; LANGSTROM, B. Convenient preparation of ^{68}Ga – based PET radiopharmaceuticals at room temperature. ***Bioconjug. Chem.***, v. 19, p. 569-573, 2008.

WANGLER, B.; SCHIRRMACHER, R.; BARTENSTEIN, P.; WANGLER, C. Chelating agents and their use in radiopharmaceutical sciences***. Mini Rev Med Chem.***, v. 11, p. 968-983, 2011.

WASER, B.; TAMMA, M.L.; CESCATO, R.; MAECKE, H.R.; REUBI, J.C. Highly efficient in vivo agonist-induced internalization of sst2 receptors in somatostatin target tissues. ***J. Nucl. Med.***, v. 50, p. 936-941, 2009

WEBER, D.A.; GREENBERG, E.J.; DIMICH, A.; KENNY, P.J.; ROTHSCHILD, E.D.; MYERS, W.P.L.; LAUGHLIN, J.S. Kinetics of radionuclides used for bone studies. ***J. Nucl. Med.***, v.10, p.8-17, 1969.

WEINBERG, A. ***A Biologia do Cancer***. Artmed, 2008. Cap. 15

WEINER, R.E.; THANKUR, M.L. Radiolabeled peptides in the diagnosis and therapy of oncological diseases. ***Appl. Radiat. Isot.***; v. 57, p. 749-763, 2002.

WILD, D.; MACKE, H.R.; WASER, B.; REUBI, J.C.; GINJ, M.; RASCH, H.; *et al*. ^{68}Ga-DOTANOC: a first compound for PET imaging with high affinity for somatostatin receptor subtypes 2 and 5. ***Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging***, v. 32, p. 724-, 2005.

WIN, Z.; RAHMAN, L.; MURREL, J.; TODD, J.; AL-NAHHAS A. ***Eur. J. Mol. Imaging***, v. 33, p. 506, 2006.

YANO, Y,; ANGER,H. O. A gallium-68 positron cow for medical use. ***J. Nucl. Med.***, v.5, p.485-488, 1964.

ZHERNOSEKOV, K.P. ***Radiochemical Aspects of Production and Processing of Radiometals for Preparation of Metalloradiopharmaceuticals***. 2006. Tese (Doutorado) - Johannes Gutenberg Universität, Mainz, Alemanha.

ZHERNOSEKOV, K.P.; FILOSOFOV, D.V.; BAUM, R.P.; ASCHOFF, P.; et al. Processing of generator-produced ^{68}Ga for medical application. ***J. Nucl. Med***.; v. 48, p. 1741 – 1748, 2007.

ZINI, J. ***Usos das cromatografias de extração e de troca iônica na separação de tório e terras raras de um resíduo gerado na unidade de purificação de tório. Aplicação das terras raras como catalisadores na geração de hidrogênio***. 2010. Dissertação (Doutorado). - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - Universidade de São Paulo, São Paulo